

Universität Bielefeld

Fakultät für Physik

Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften

Gruppenleiter: Prof. Dr. Dario Anselmetti

Bachelorarbeit

Rasterkraftmikroskopische Strukturanalyse von Xanthan

Dem Prüfungsausschuss im Januar 2016

zur Erlangung des Grades eines Bachelor of Science in Biologie

vorgelegt von

Julia Teckentrup

Erstgutachter: Prof. Dr. Karsten Niehaus

Zweitgutachter: Dr. Volker Walhorn

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig verfasst und gelieferte Datensätze, Zeichnungen, Skizzen und graphische Darstellungen selbständig erstellt habe. Ich habe keine anderen Quellen als die angegebenen benutzt und habe die Stellen der Arbeit, die anderen Werken entnommen sind - einschl. verwendeter Tabellen und Abbildungen - in jedem einzelnen Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Bielefeld, den

_____ (Unterschrift)

Julia Teckentrup

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung und theoretischer Hintergrund	2
2.1 Xanthan.....	2
2.1.1 Aufbau und Synthese von Xanthan.....	2
2.1.2 Nutzung und Fermentation von Xanthan	4
2.1.3 Polymermodelle	6
2.2 Rasterkraftmikroskopie	8
2.2.1 Aufbau und Methode der Messung.....	8
2.2.2 Kraftwechselwirkungen	10
2.2.3 Betriebsmodi	11
2.3 Versuchsspezifische Informationen und Motivation.....	12
3. Material und Methoden	15
3.1 Proben und Präparation	15
3.2 Software und Einstellungen des AFMs	16
3.3 Datenanalyse.....	17
4. Ergebnisse und Diskussion	20
4.1 Xanthan JBL007	20
4.2 Xanthan iFliC	24
4.3 Xanthan iFliM.....	27
4.4 Xanthan i2791.....	30
4.5 Acetatfreies Xanthan	32
4.6 Pyruvatfreies Xanthan	36
5. Vergleich der Proben	40
5.1 Übersicht.....	40
5.2 Höhenprofil.....	42
5.3 Konturlänge	46
5.4 Persistenzlänge	49
5.5 Zusammenfassung der Strukturparameter	50
5.6 Auswirkungen auf die Viskosität	51
6. Fazit und Ausblick	56
7. Literatur	58

1. Zusammenfassung

Biopolymere sind sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Funktion sehr variabel, ihre strukturellen und mechanischen Parameter variieren stark. Je nach Art des Polymers können einerseits flexible Bereiche, andererseits auch steife, fast unbewegliche Bereiche vorhanden sein. Polymere lassen sich über verschiedenste Modelle physikalisch beschreiben. So lässt sich auch das vom Bakterium *Xanthomonas campestris* synthetisierte Polysaccharid Xanthan, welches in der Industrie vor allem als Verdickungsmittel eingesetzt wird, durch Polymermodelle beschreiben. Die unterschiedlichen mechanischen Parameter des Xanthans wirken sich auf dessen rheologische Eigenschaften aus und sind aus diesem Grund ein wichtiger Faktor in der industriellen Nutzung. Anhand von rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Stämme von *X. campestris* strukturell unterschiedliches Xanthan produzieren. Die Xanthane unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl der Stränge, welche das Molekül aufbauten (Einzelstrang/Doppelstrang), als auch in ihrer Persistenz- und Konturlänge.

2. Einleitung und theoretischer Hintergrund

2.1 Xanthan

Das Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gehört zu der Gruppe der gramnegativen Proteobakterien. *X. campestris* ruft als Pflanzenpathogen Krankheiten in teils ökonomisch wichtigen Pflanzen hervor, so z.B. in Reis (*Oryza sativa*) oder Kohl (*Brassica*) (Vorhölter et al., 2007).

Neben seiner phytopathogenen Eigenschaft ist *X. campestris* noch aus einem weiteren Grund ein wichtiger Modellorganismus in der biotechnologischen Forschung. Das Bakterium produziert das Polysaccharid Xanthan, welches direkt nach der Synthese in das Medium, welches das Bakterium umgibt, abgegeben wird, weshalb man auch von einem Exopolysaccharid spricht (Vorhölter et al., 2007). Lagern sich viele Bakterien zusammen, so sind sie durch die Produktion von Exopolysacchariden gegenüber Hitze oder anderen Einflüssen geschützt (Biofilm) (Gottschalk, 2015 (S. 285-287)). Das von *X. campestris* produzierte Xanthan schirmt also das Bakterium ab, so dass es vor äußeren Einflüssen geschützt ist (Hublik, 2012).

2.1.1 Aufbau und Synthese von Xanthan

Das Xanthanrückgrat besteht aus D-Glucoseeinheiten, an welche D-Mannose- sowie D-Glucuronsäureeinheiten gebunden sind (s. Abbildung 1). Dies geschieht in einem Verhältnis von 2:2:1, weshalb eine Untereinheit von Xanthan auch ein Pentasaccharid ist (Vorhölter et al., 2007). Viele der Pentasaccharide zusammengelagert ergeben das Polysaccharid Xanthan. An die D-Mannoseeinheiten können sowohl Acetat- als auch Pyruvatgruppen gebunden sein, welche die Struktur verändern (Hublik, 2012). Aus Röntgenbeugungsexperimenten ist bekannt, dass Xanthan sehr wahrscheinlich als rechtsgewundene Helix vorliegt, wobei die Seitenketten die Helix umschließen. Anhand der Röntgenbeugungsspektren konnte allerdings nicht darauf geschlossen werden, ob die Helix aus einem einzelnen Xanthanstrang besteht, oder ob eine Doppelhelix vorliegt (Moorhouse et al., 1977). Bei geringen, physiologisch relevanten Temperaturen liegt das Xanthan als geordnete Helixstruktur vor, welche bei höheren Temperaturen in eine ungeordnete Form übergeht. Dieser Übergang wird auch als "Helix-Coil-Transition" bezeichnet und ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Pyruvatanteil und Salzkonzentration der Lösung (Arendt und Kulicke, 1998). Bis heute ist aber ungeklärt, ob natives Xanthan die Form eines Einzel- oder Doppelstrangs einnimmt (Shatwell et al., 1990).

X. campestris synthetisiert Xanthan aus Zuckernucleotiden, welche aus der Umgebung aufgenommen oder selber synthetisiert, und in Stoffwechselprozessen umgesetzt werden müssen. Gesteuert wird die Xanthan-Synthese von einem Gen-Cluster, welches sich aus 12 Genen (*gumB* – *gumM*) zusammensetzt und welche für die Proteine bestimmter Abschnitte der Synthese codieren (vgl. Abbildung 2). Die Synthese des Polysaccharids ist durch die Beteiligung dieser vielen verschiedenen Proteine für das Bakterium sehr energieintensiv. Nach erfolgter Synthese wird das Xanthan aus der Zelle in das umgebende Medium exportiert. Der genaue Mechanismus des Exports ist noch unbekannt (Vorhölter et al., 2007).

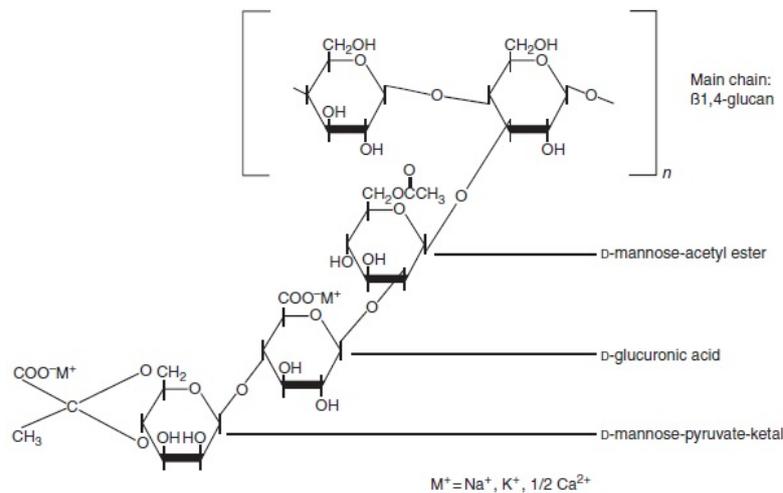


Abbildung 1: Strukturformel von Xanthan. An das Glucosegrundgerüst sind D-Mannose- und D-Glucuronsäureeinheiten geknüpft. Insgesamt stehen Glucose, Mannose und Glucuronsäure im Xanthanmolekül im Verhältnis 2:2:1. Viele dieser Pentasaccharideinheiten zusammen ergeben ein Xanthanmolekül (Hublik, 2012).

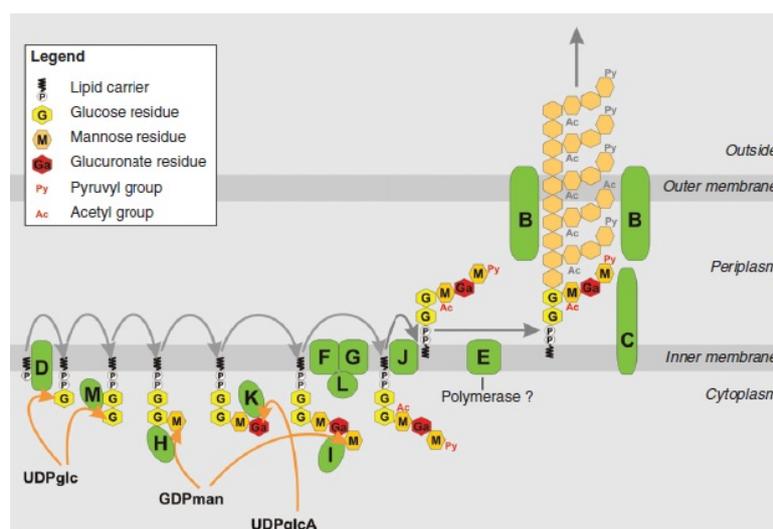


Abbildung 2: Modell der Xanthansynthese. Die Synthese findet an der Membran von *X. campestris* statt, von wo aus das Xanthan direkt in das Außenmedium abgegeben werden kann. Die grünen Kästen zeigen die Proteine, welche für die Synthese benötigt werden (Vorhölter et al., 2007).

2.1.2 Nutzung und Fermentation von Xanthan

Außer der für das Bakterium wichtigen Nutzung des Xanthans als Schutz vor äußeren Einflüssen ergeben sich auch mögliche Anwendungen in der Industrie. Durch seine interessanten rheologischen Eigenschaften findet es Verwendung in einem breiten Spektrum von Bereichen, z.B. in der Lebensmittelindustrie. Schon in geringen Konzentrationen weist Xanthan im Gegensatz zu anderen Hydrokolloiden eine hohe Viskosität auf. Darüber hinaus ist die Viskosität sowohl über einen großen pH-Bereich stabil (pH 2-12), sowie auch über einen breiten Temperaturbereich annähernd konstant (bis zu etwa 80 °C). Aufgrund seiner hohen Viskosität wird Xanthan sowohl in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie als Verdickungsmittel, als auch in der Erdölgewinnung eingesetzt (Hublik, 2012).

Die Gewinnung von Xanthan für industrielle Zwecke basiert auf Fermentation. *X. campestris* Zellen werden in einem Bioreaktor (s. Abbildung 3) auf einem stickstoffhaltigen Zuckermedium (Glucose, Sucrose oder Stärke) unter Zuführung von Sauerstoff aufgezogen, bis sie eine Größe erreicht haben, bei der sie anfangen Xanthan zu synthetisieren. Hierbei werden die physiologischen Bedingungen so konstant wie möglich gehalten. Die Temperatur wird zwischen 28 und 32 °C reguliert, der pH-Wert liegt zwischen 6,5 und 7,5. Nach der Exkretion des Xanthans durch *X. campestris* in das umgebende Medium, wird die Kultur erhitzt um die noch lebenden Zellen abzutöten und die Enzyme, welche vom Bakterium zum Polysaccharidabbau gebraucht werden, zu denaturieren. Darauf folgt die Fällung des Xanthans durch Isopropanol, die Abtrennung erfolgt dann mittels Zentrifugation oder Filtration. In den letzten Schritten wird das noch feuchte Xanthan erst getrocknet und schließlich gemahlen (vgl. Abbildung 4). Am Ende liegt es als weißes, geschmacksneutrales Pulver vor, welches mit Wasser gemischt die typisch viskose Lösung ergibt, die z.B. als Verdickungsmittel eingesetzt werden kann (Hublik, 2012).

Xanthan kann auf vielfältige Art und Weise angepasst und verändert werden, so dass es für jeden Anwendungsbereich spezifische Bedingungen erfüllt. Die Veränderungen finden dabei auf mehreren Ebenen statt. Es können entweder Veränderungen der Molekularstruktur (z.B. Hinzufügen oder Abtrennen von Acetyl- oder Pyruvatgruppen an den Mannoseseitenketten), Veränderungen während der Aufreinigung (z.B. Abtrennen der abgetöteten Bakterienzellen durch Zentrifugation) oder Veränderungen des Endprodukts (z.B. Hinzufügen eines Emulgators) vorgenommen werden (Hublik, 2012). Je nach Bedarf und Anwendungsbereich kommen andere Methoden zum Einsatz.

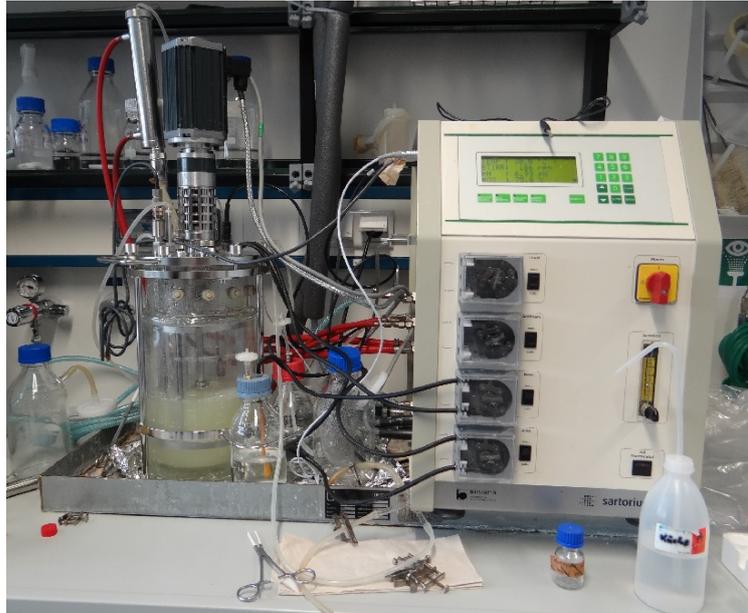


Abbildung 3: Ein Bioreaktor, in welchem Xanthan durch die *X. campestris* Zellen synthetisiert wird. Mithilfe von Feedback-Mechanismen werden die physiologischen Parameter (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffsättigung) konstant gehalten. Das Bild zeigt den Aufbau der Arbeitsgruppe Proteom- und Metabolomforschung von Prof. Dr. Niehaus an der Universität Bielefeld.

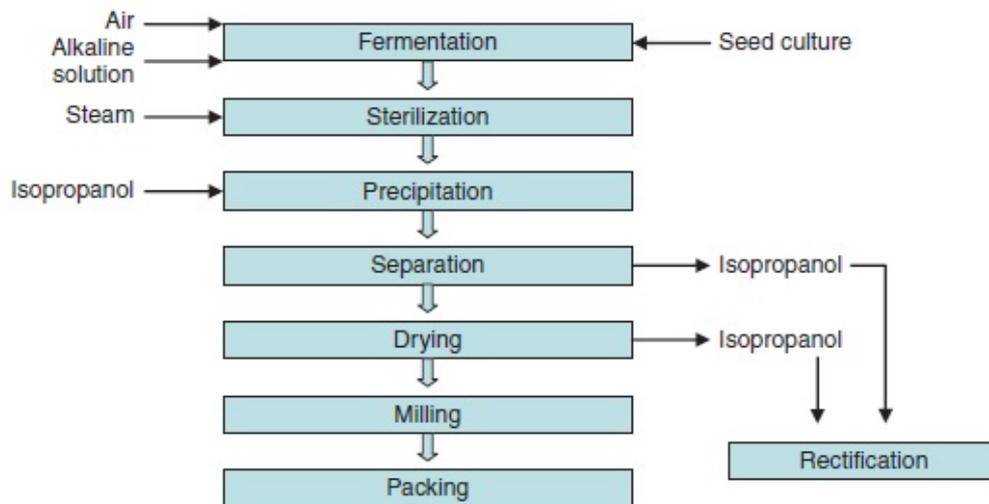


Abbildung 4: Herstellungsprozess von Xanthan. Die Bakterien werden in einem Bioreaktor mit stickstoffhaltigem Nährmedium aufgezogen, in welchem Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffsättigung annähernd konstant gehalten werden. Nach der Bildung des Xanthans durch die *X. campestris* Zellen wird die Kultur erhitzt, das Xanthan mit Isopropanol gefällt und abzentrifugiert, getrocknet und schlussendlich gemahlen (Hublik, 2012).

2.1.3 Polymermodelle

(Bio-)Polymere wie Xanthan lassen sich physikalisch durch verschiedene Modelle beschreiben, um deren intrinsische Eigenschaften darzustellen. Die Modelle unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Annahmen und Komplexität.

Das einfachste Modell zur Beschreibung von Polymeren stellt das sogenannte Modell der frei beweglichen Kette (engl: freely-jointed chain (FJC)) dar. Hierbei wird ein Polymer in Monomere, einzelne, steife Teilstücke der Länge L unterteilt. Diese können sich in alle Richtungen frei bewegen, wobei Wechselwirkungen der Moleküle untereinander vernachlässigt werden (Ogden et al., 2006 und Rubinstein und Colby, 2003 (S. 52)).

Eine Verbesserung des Freely-Jointed-Chain-Modells ist durch das Modell der Freely-Rotating-Chain (FRC) gegeben. In diesem Modell wird das Polymer ebenfalls, wie im Freely-Jointed-Chain-Modell, durch steife Teilstücke der Länge L modelliert, dessen Wechselwirkungen vernachlässigt werden. Allerdings werden hier die festen Bindungswinkel zwischen den einzelnen Segmenten miteinbezogen. Das Polymer kann so keine Bindungsrotation mehr eingehen, es ist nur noch Torsionsrotation möglich (Kratohvíl und Suter, 1989). Das Freely-Jointed-Chain-Modell, sowie das Freely-Rotating-Chain-Modell können aufgrund ihrer Annahmen nur auf flexiblere Polymere angewendet werden.

Das Modell der wurmartigen Kette (engl.: worm-like chain (WLC)) stellt das komplexeste der drei Modelle dar und kann als Spezialfall des Freely-Rotating-Chain-Modells angesehen werden (Rubinstein und Colby, 2003 (S. 57)). Dem Modell liegt die Annahme zugrunde, dass ein Polymer als ein Stab angesehen werden kann, welcher sich durch thermische Fluktuationen zufällig bewegt (Bustamante et al., 2003). Mit diesem Modell können sämtliche lineare Polymere beschrieben werden, wobei es am besten für steife Polymere geeignet ist (Kratohvíl und Suter, 1989 und Rubinstein und Colby, 2003 (S. 57)). Es können zum Beispiel Kraftkurven mittels des Worm-Like-Chain-Modells modelliert werden (Abels et al., 2005):

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_P} \right) \cdot \left[\frac{1}{4 \left(\frac{1-x}{L_C} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_C} \right] \quad (1)$$

mit k_B = Boltzmann Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23} \frac{J}{K}$), T = Temperatur (in Kelvin), L_P = Persistenzlänge, L_C = Konturlänge und x = Auslenkung (Marko&Siggia, 1995).

Um strukturelle Parameter von Polymeren zu beschreiben nutzt man die dem worm-like chain Modell zugrundeliegende Persistenzlänge, welche die Steifheit eines Polymers beschreibt (Waigh, 2007 (S. 171)). Je größer die Persistenzlänge, desto steifer ist das Polymer. Für semi-flexible Polymere berechnet sich die Persistenzlänge über die Länge, auf welcher die Tangenten an den Monomeren des Polymers ihre Korrelation verlieren (vgl. Abbildung 5) (Waigh, 2007 (S. 172)):

$$\langle \cos \theta \rangle = e^{-\frac{l}{sL_P}} \quad (2)$$

mit θ = Winkel zwischen zwei Monomeren die sich in einem Abstand der Länge l zueinander befinden und s = ein Oberflächenparameter (Lamour et al., 2014). Hieraus erhält man für die Persistenzlänge L_P (Abels et al., 2005):

$$L_P = \frac{l}{\ln(\cos \theta)} \quad (3)$$

Die Konturlänge L_C eines Polymers stellt die aufaddierte Länge dessen einzelner Teilstücke dar (Fixman und Kovac, 1973):

$$L_C = n \cdot l \quad (4)$$

Auch Xanthan lässt sich mittels des WLC Modells darstellen (Shatwell et al., 1990).

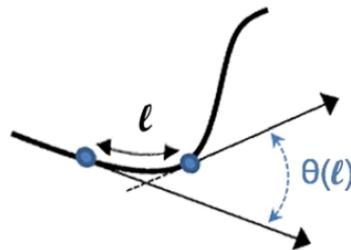


Abbildung 5: Darstellung der Methode zur Berechnung der Persistenzlänge L_P . θ ist der Winkel zwischen zwei Tangenten an der Kontur zweier Monomere des Stranges, welche sich in einem Abstand l voneinander befinden. Die Persistenzlänge ist dann definiert als die Länge, auf welcher die Tangenten ihre Korrelation verlieren (Lamour et al., 2014).

2.2 Rasterkraftmikroskopie

Der Auflösungsbereich normaler optischer Mikroskope ist durch die Beugung von Licht auf etwa die Hälfte der Wellenlänge des verwendeten Lichts ($\frac{\lambda}{2}$) begrenzt (Lipson et al., 1997 (S. 212-214)). Die kleinstmögliche Auflösung liegt somit in einem Bereich von ca. 200-300 nm. Dieser Bereich liegt oft über der Größe von bedeutsamen biologischen Strukturen, wie zum Beispiel der Desoxyribonukleinsäure (DNS), welche nur einen Durchmesser von ungefähr zwei Nanometern aufweist (Campbell und Reece, 2009 (S. 430)).

Um diese Strukturen gut abbilden zu können, werden andere Techniken gebraucht als die herkömmliche optische Mikroskopie. Rastersondentechniken, welche in diesen Bereichen auflösen können, haben in den letzten Jahrzehnten stark an Popularität zugenommen und sind heute aus den Laboren nicht mehr wegzudenken. Allen Rastersondentechniken ist gemein, dass sie keine Linsen benötigen, sondern dass die Oberfläche der Probe mithilfe einer idealerweise atomar feinen Spitze abgerastert wird (Morris et al., 1999 (S. 5)). Das sogenannte Rasterkraftmikroskop (RKM, engl.: Atomic Force Microscope (AFM)) ist eine Weiterentwicklung des von Gerd Binnig und Heinrich Rohrer 1982 entwickelten Rastertunnelmikroskops (RTM, engl.: Scanning Tunneling Microscope (STM)). Der Vorteil des Rasterkraftmikroskops gegenüber dem Rastertunnelmikroskop ist, dass die Probe, sowie die Oberfläche nicht leitend sein müssen, was die Handhabung der Proben stark vereinfacht (Weitze, 2003 (S.6, 21-23)).

2.2.1 Aufbau und Methode der Messung

Das Hauptelement des Rasterkraftmikroskops ist der Cantilever, welcher eine typische Länge zwischen 100-200 μm besitzt und dessen Ende aus einer sehr feinen Spitze besteht (s. Abbildung 6) (Mäntele, 2012 (S.259/260)). Diese Spitze wird bis auf wenige Nanometer an die Probe herangebracht (Nahfeld-Mikroskopie). Die Probe wird auf einem Scanner mit piezoelektrischen Stallelementen angebracht, welcher in x-, y- und z-Richtung verstellt werden kann. So ist es möglich, die Probe an einer bestimmten Stelle unter dem Cantilever zu positionieren. Auf die Rückseite des Cantilevers wird ein Laserstrahl gerichtet, welcher vom Cantilever auf eine 4-Quadranten-Diode reflektiert wird. Während einer Messung wird die Spitze zeilenweise über die Probenoberfläche geführt, so dass sich der Laserstrahl auf den vier Quadranten der Diode aufgrund der unterschiedlichen Erhebungen und Vertiefungen der Probe verschiebt. Der Intensitätsunterschied des Lasersignals auf den Quadranten der Diode wird als Maß für die Auslenkung des Cantilevers verwendet und in ein Signal umgewandelt, welches am Computer ein Bild der Topographie der Probe liefert. Im Falle einer 4-

Quadranten-Diode lassen sich vertikale von lateralen Bewegungen, z.B. Reibung, unterscheiden (Morris et al., 1999 (S. 7)).

Aufgrund der Geometrie der Spitze des Cantilevers kommt es bei relativ schmalen und flachen Proben zu einem Phänomen, welches allgemein als "probe broadening" bekannt ist. Da die Spitze des Cantilevers breiter ist als viele biologische Proben, stellt das erhaltene rasterkraftmikroskopische Bild eine Faltung der Topographie der Probe mit der Spitzengeometrie dar (Morris et al., 1999 (S.32-33, 61)).

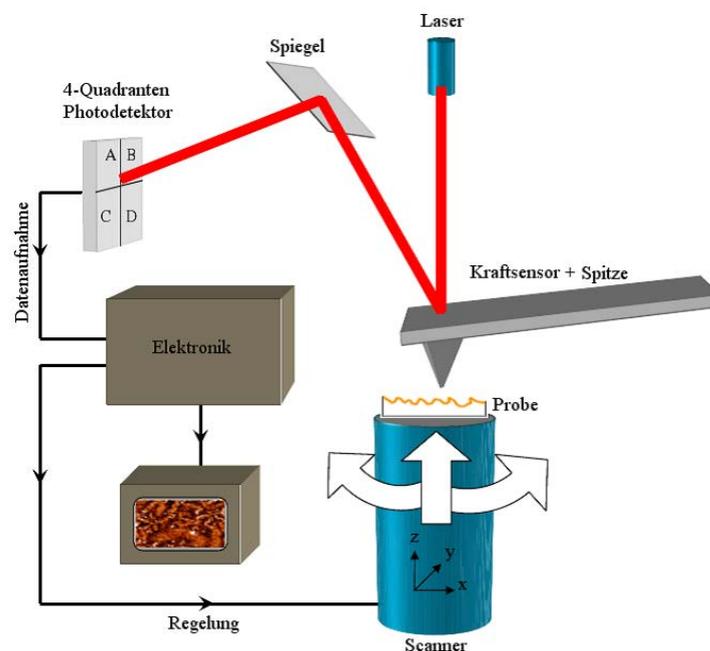


Abbildung 6: Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (schematisch). Das Mikroskop besteht aus einem piezoelektrisch verstellbaren Tisch auf welchem die Probe angebracht wird. Mit dem Cantilever wird die Probe abgerastert, eine Diode registriert mithilfe eines Lasers die Bewegung des Cantilevers auf der Probe. Diese Informationen werden über die Regelelektronik an den Computer gesendet (Harder, 2009).

2.2.2 Kraftwechselwirkungen

Bringt man die Spitze des Cantilevers in das Nahfeld der Probe, so kommt es zu interatomaren Wechselwirkungen zwischen den Atomen der Spitze sowie den Atomen der Probenoberfläche. Die Kräfte, welche bei der Wechselwirkung der Spitze mit der Probenoberfläche eine Rolle spielen, können sowohl kurzreichweitig als auch langreichweitig sein. Zu den kurzreichweitigen Kräften gehören die Pauli-Abstoßung (Reichweite ca. 0,1 nm), die sich dadurch ergibt, dass die Elektronen zweier voll besetzter Orbitale sich gegenseitig abstoßen, da keine zwei Elektronen mit den gleichen Quantenzahlen gleichzeitig am selben Ort sein können. Auch die Kapillarkraft (Reichweite bis 10 nm) gehört zu den kurzreichweitigen Kräften. Sie kommt dadurch zustande, dass ein dünner Flüssigkeitsfilm und/oder Kondenswasser einen Meniskus bilden, welcher den Cantilever zur Oberfläche zieht. Zu den langreichweitigen Kräften zählen die Coulombkraft (>100 nm Reichweite) sowie die van-der-Waals-Kraft (Reichweite ca. 100 nm) (Meyer, 1992 und Sarid und Elings, 1991). Die Coulombkraft tritt ausschließlich zwischen Ionen auf. Diese ziehen sich bis auf eine gewisse Entfernung stark an, kommen sie sich jedoch zu nahe, so kommt die Pauli-Abstoßung zum Tragen. Im Gegensatz zu der Coulombkraft entstehen van-der-Waals-Kräfte auch zwischen ungeladenen Atomen. Dies kommt dadurch zustande, dass die Ladungsverteilung in Atomen oder Molekülen fluktuiert, wodurch auch in ungeladenen Atomen oder Molekülen kurzzeitig Dipole entstehen, welche in anderen Molekülen ebenfalls einen Dipol induzieren können (Morris et al., 1999 (S. 44-49)). Die genannten Wechselwirkungen lassen sich durch das Lennard-Jones-Potential als Funktion (s. Abbildung 7) des Abstands r beschreiben, welches sich aus einer abstoßenden sowie einer anziehenden Komponente zusammensetzt:

$$\phi(r) = 4 \varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (5)$$

Hierbei sind σ ein Abstandsparameter und ε ein Energieparameter, welche materialabhängig sind (Cotterill, 2008 (S. 33-36)). Bei kleinen Abständen zwischen Cantilever und Probe kommt es zu einer Abstoßung, wobei der Cantilever von der Oberfläche ausgelenkt wird, bei größeren Abständen kommt es zu einer attraktiven Kraft, wodurch der Cantilever zur Probenoberfläche hin ausgelenkt wird (Mäntele, 2012 (S.261/262)). Wird der Abstand r groß, so strebt das Potential ϕ gegen Null und die Wechselwirkungskräfte verschwinden. Die attraktiven und repulsiven Kräfte die den Cantilever auslenken, werden durch den Laser und die Quadranten-Diode detektiert.

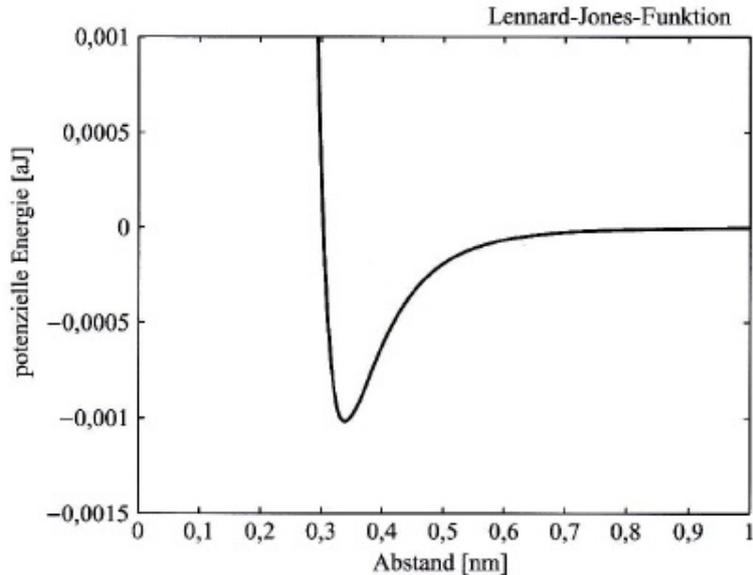


Abbildung 7: Das Lennard-Jones-Potential für interatomare Kräfte (Cotterill, 2008 (S. 34)).

2.2.3 Betriebsmodi

Es wird generell zwischen zwei Messmodi unterschieden, dem Kontakt-Modus und dem Nichtkontakt-Modus. Beim Nichtkontakt-Modus ("Non-Contact Mode") wird die Spitze in einem gewissen Abstand über die Probenoberfläche geführt, beim Kontakt-Modus ("Contact Mode") berührt die Spitze die Probe während der gesamten Messung. Hier kann es zu lateralen Kräften kommen, die unter Umständen die Probe beschädigen können, insbesondere wenn es sich um empfindliche biologische Moleküle handelt. Diese lateralen Kräfte lassen sich durch die Nutzung des "Tapping"-Modus ("Intermittent-Contact Mode") minimieren (Meyer, 1992). Hierbei wird der Cantilever mit einer Sinusfrequenz in Schwingung versetzt, welche nahe bei seiner Resonanzfrequenz ω_0 liegt und schwingt so mit der Frequenz f_0 und einer Amplitude A_0 (Legleiter, 2009). Der Cantilever berührt die Probe in diesem Modus immer nur am unteren Umkehrpunkt der Schwingung (Rademacher, 2007). Wird der Cantilever dann nahe an die Probe gefahren, so verringert sich durch die oben genannten interatomaren Kraftwechselwirkungen die freie Amplitude A_0 , so dass eine gedämpfte Amplitude A erreicht wird. Während der Messung werden dann die vertikalen Änderungen der Scannerposition aufgezeichnet (Legleiter, 2009). Diese Informationen werden genutzt um ein Bild der Topographie der Probe zu erzeugen.

2.3 Versuchsspezifische Informationen und Motivation

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur unterschiedlicher Arten von Xanthan, welche von verschiedenen *X. campestris* Stämmen sekretiert wurden, mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Die verschiedenen Xanthanarten wurden von einem Ausgangsstamm sowie von Mutanten von *X. campestris* synthetisiert. Da Xanthan industriell vor allem als Verdickungsmittel eingesetzt wird, ist das Bestreben nach einem möglichst viskosen Xanthan sehr hoch, um es einfach und in geringen Mengen einsetzen zu können. Um mehr und viskoseres Xanthan herstellen zu können, als es der Wildtyp produziert, wurde der Wildtyp auf die Xanthanproduktion selektiert. In die Bakterien dieses Ausgangsstammes wurden wiederum selektiv Mutationen eingefügt, um herauszufinden ob diese Stämme viskoseres Xanthan synthetisieren können (Steffens, 2015, unpubliziert).

In Kooperation mit der Firma Jungbunzlauer AG in Pernhofen, Österreich wurden einige der Mutanten des Ausgangsstammes produziert und auf ihre Xanthanproduktion getestet. Den Mutanten fehlte dabei entweder die Flagelle oder die Flagelle mitsamt dem Basalapparat. Um mithilfe der Flagelle eine gerichtete Bewegung durchzuführen, ist ein Protonengradient erforderlich. Durch Protonenpumpen werden H^+ -Ionen aus der Zelle transportiert, die Rückdiffusion dieser Ionen treibt dann den Flagellenmotor (Basalapparat) an (Campbell und Reece, 2009 (S.749 - 750)). Die Nutzung und Erhaltung der Flagelle kostet das Bakterium aufgrund der Beteiligung der Protonenpumpen viel Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Während der Kultivierung von *X. campestris* ist die Flagelle nicht erforderlich, die Energie wird unnötig in ihre Erhaltung investiert. Es wurde vermutet, dass Bakterien mit fehlender Flagelle die Energie in die Xanthanproduktion investieren können. Bei Viskositätsmessungen konnte bestätigt werden, dass die Mutanten von *X. campestris*, welchen die Flagelle bzw. der Basalapparat fehlten, viskoseres Xanthan als der Ausgangsstamm produzierten (Steffens, 2015, unpubliziert).

Weiterhin wurden Mutanten produziert, welche chemisch verändertes Xanthan synthetisieren. Dem synthetisierten Xanthan fehlten entweder eine Acetylgruppe oder eine negativ geladene Pyruvatgruppe, welche normalerweise an der Mannoseseitenkette der Pentasaccharideinheiten gebunden sind. Es wurde vermutet, dass die Änderung in der Struktur des Xanthans eine Auswirkung auf dessen mechanische Parameter sowie dessen Viskosität hat. Diese Vermutungen wurden schon früher unter anderem von Sandford et al. (1977), Smith et al. (1981) und Bradshaw et al. (1983) aufgestellt, wobei es zu unterschiedlichsten Ergebnissen kam.

Die von Steffens (2015, unpubliziert) gemessenen Viskositätswerte zeigten, dass acetatfreies Xanthan in etwa die Viskosität des Ausgangsstammes aufwies, wohingegen das pyruvatfreie Xanthan eine deutliche höhere Viskosität besaß.

Um herauszufinden, warum die Viskositäten der Xanthane der *X. campestris* Mutanten sich von der des Ausgangsstammes unterscheiden, wurden die Messungen der verschiedenen Arten von Xanthan am Rasterkraftmikroskop durchgeführt. Außerdem sollten die Messungen zur Aufklärung der strukturellen und mechanischen Parameter des Xanthans dienen. Die erhaltenen mikroskopischen Daten der Xanthanarten sollen anhand ihrer strukturellen Parameter verglichen und unter anderem im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Viskositätswerten diskutiert werden.

Die folgenden Sachverhalte wurden experimentell überprüft. Es wurde vermutet, dass das Xanthan der *X. campestris* Stämme, welche Xanthan mit veränderter Molekularstruktur (acetatfreies und pyruvatfreies Xanthan) produzieren, mit höherer Wahrscheinlichkeit Doppelstränge bildet als das Xanthan des Wildtyps. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass der Wildtyp von *X. campestris* zu einem Großteil einzelsträngige Polymere synthetisiert, was sich aufgrund der Höhen der mit dem Rasterkraftmikroskop gemessenen Bilder erkennen ließ (Walhorn und Al-Hamood, 2015, unpubliziert). Durch die Veränderung der Ladungsverteilung des Xanthans aufgrund der Deacetylierung bzw. Depyruvatisierung könnte es deswegen vermehrt zur Bildung von Doppelsträngen kommen. Außerdem wurde vermutet, dass die Konturlänge keine Auswirkungen auf die Viskositäten der Xanthane der *X. campestris* Stämme hat. Liegen lange Polymere in der Probe vor, so sollten diese in Wechselwirkungen mit anderen Molekülen in etwa die gleichen Auswirkungen besitzen wie viele kurze Polymere. Die Länge der Stränge sollte so für die Viskosität nicht von entscheidender Bedeutung sein. Desweiteren wurde vermutet, dass sich die Persistenzlänge der Xanthanstränge auf die Viskosität der Xanthane auswirkt. Xanthanstränge welche eine höhere Steifigkeit, also eine höhere Persistenzlänge aufweisen, sind in ihren Bewegungsmöglichkeiten eingeschränkter als flexiblere Polymere. Daraus resultiert, dass steifere Polymere mit anderen Polymeren festere Bindungen eingehen und so die Viskosität der Lösung erhöhen sollten.

Folgende Arbeitshypothesen wurden aufgestellt:

H_1 : Das acetatfreie, sowie das pyruvatfreie Xanthan sind signifikant höher, als das des Ausgangsstammes JBL007.

H_2 : Die Konturlänge der Xanthane hat keine Auswirkungen auf deren Viskosität in Lösung.

H_3 : Steifere Polymere bilden eine viskosere Lösung als flexiblere Polymere.

3. Material und Methoden

3.1 Proben und Präparation

Als Proben dienten verschiedene Arten von Xanthan, welche von der Arbeitsgruppe Proteom- und Metabolomforschung der Universität Bielefeld aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Kulturen extrahiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Untersucht wurden das Xanthan eines Ausgangsstamms (JBL007) und das Xanthan von fünf Mutanten des Ausgangsstamms JBL007 (iFliM, iFliC, i2791, acetatfreies- und pyruvatfreies Xanthan (s. Tabelle 1)). Der *X. campestris* Stamm JBL007 entstand durch Selektion des Wildtyps B100 auf die Xanthanproduktion. Alle verwendeten Proben lagen in deionisiertem Wasser gelöst und in einer Ausgangskonzentration von $1 \frac{mg}{ml}$ vor. Jede der Proben wurde vor der Präparation mit MilliQ-Wasser soweit verdünnt, dass auf den Mikroskopiebildern Einzelstränge abgebildet werden konnten. Die Verdünnungen lagen für die sechs Proben im Bereich zwischen 1:100 und 1:500. Um das Xanthan mit dem Rasterkraftmikroskop abbilden zu können, wurde zuerst ein Stück Glimmer ("Mica") zurechtgeschnitten und die Kanten abgerundet. Das fertige Stück Glimmer wurde 2-3 Mal mit Klebeband gespalten um eine saubere Oberfläche zu erhalten. Dann wurden $5 \mu l$ der verdünnten Probe auf das Glimmerplättchen pipettiert und für etwa 20-30 Sekunden inkubiert. Das Glimmerplättchen wurde anschließend mit Stickstoff abgeblasen und getrocknet. Mit doppelseitigem Klebeband wurde die Probe auf ein Metallplättchen ($\varnothing 1,5$ cm) geklebt und mithilfe einer Pinzette an den Rändern festgedrückt.

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit genutzten Arten von Xanthan. Die Bezeichnungen und Eigenschaften beziehen sich auf das Bakterium *X. campestris* beziehungsweise deren Mutanten.

Xanthanart	Bezeichnung	Eigenschaft
Ausgangsstamm	JBL007	Selektiert auf Xanthanproduktion
Mutante von JBL007	iFliC	Flagelle fehlend
Mutante von JBL007	iFliM	Basalapparat und Flagelle fehlend
Mutante von JBL007	i2791	Gennummer; Produkt der Proteinbiosynthese für dieses Gen unbekannt
Mutante von JBL007	acetatfrei	Acetylgruppe des Xanthans fehlend
Mutante von JBL007	pyruvatfrei	Pyruvatgruppe des Xanthans fehlend

3.2 Software und Einstellungen des AFMs

Die Visualisierung des Xanthans erfolgte an zwei verschiedenen Rasterkraftmikroskopen (Bruker, USA), am Multimode 5, sowie am Multimode 8 (s. Abbildung 8). Die rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden in der Arbeitsgruppe Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften an der Universität Bielefeld durchgeführt.

Die fertige Probe wurde auf einem magnetischen Probenhalter fixiert, der Cantilever wurde in die 3-Punkt-Halterung eingelegt und ebenfalls fixiert. Für die Messungen wurden Cantilever aus Silizium mit einer Aluminium-Reflex Beschichtung, einer Resonanzfrequenz von 300 kHz und einer Federkonstanten von $40 \frac{N}{m}$ genutzt (BudgetSensors, Bulgarien). Der Laser wurde auf die Spitze des Cantilevers gerichtet und die Probe soweit wie möglich manuell angenähert. Hierbei wurden Abbruchkanten der Glimmeroberfläche scharf gestellt und dann so lange angenähert, bis der Cantilever wieder scharf auf dem Bildschirm erkennbar war. Das Signal für die vertikale und horizontale Abweichung des Lasers wurde vor Beginn der Messung auf Null gestellt. Ein Dämpfungstisch TS150 (TableStable LTD, Schweiz) sorgte während der Messungen für die notwendige Dämpfungsabschirmung, sowie eine Geräuschhaube (Park Systems, Korea) für die Geräuschabschirmung.

In der Software Nanoscope (Versionen 5.30 und 8.15) wurden die Einstellungen des Cantilevers vorgenommen (manuell oder per „Auto Tune“-Funktion), so dass die Zielamplitude etwas unter der Resonanzfrequenz des Cantilevers lag (Abweichung vom Peak der Funktion ungefähr 3-5 %). Die Anzahl der Bildpunkte wurde auf 512 pro Zeile eingestellt um ein schärferes und detailreicheres Bild zu erhalten. Für Übersichtsaufnahmen ($5 \mu m$ und größer) wurde die Anzahl der Bildpunkte auf 1280 pro Zeile gestellt. Beim Starten der Messung nähert das Programm den Cantilever automatisch soweit an die Probe an, wie es für die Messung notwendig ist. Fünf bis zehn Sekunden nach dem Starten der Messung wurde der Cantilever wieder von der Probenoberfläche abgehoben um die Cantilevereinstellungen nochmals zu überprüfen. Nach erfolgter Überprüfung wurde schließlich die Messung durchgeführt.

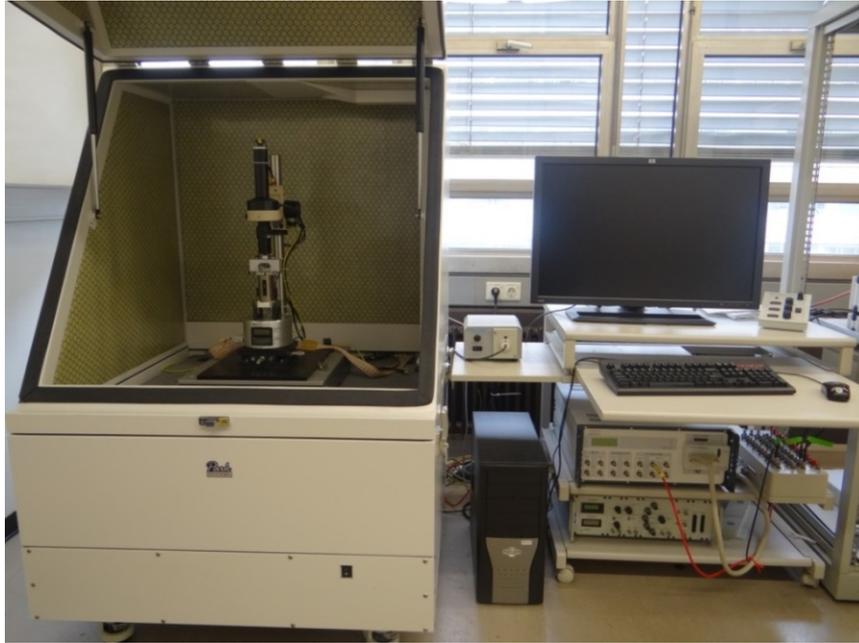


Abbildung 8: Das Multimode 8 (Bruker, USA) mit Steuerungselektronik.

3.3 Datenanalyse

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels der frei erhältlichen Software Gwyddion (Version 2.4.2). Die weitere Analyse der Daten wurde mithilfe des Programmes Easyworm sowie des Statistikprogrammes R (Version 3.2.2) durchgeführt.

Im Programm Gwyddion wurde gegebenenfalls mittels einer 2D Fast-Fourier-Transformation das Rauschen aus den Rasterkraftmikroskopiebildern herausgefiltert. Bei den (gefilterten) Bildern wurden dann die horizontalen Fehlerzeilen korrigiert, sowie die Daten nivelliert. Bei allen Bildern wurde der Minimalwert der Höhenverteilung als Nullpunkt gesetzt, als auch die Farbskalierung für jedes Bild angepasst.

In Gwyddion konnten dann die Höhen der Xanthanstränge bestimmt werden (vgl. Abbildung 9). Die Höhe eines Einzelstranges wurde aus fünf Höhenwerten gemittelt, die Mittelwerte aller Einzelstränge einer Probe wurden erneut gemittelt um daraus einen Gesamtmittelwert für eine Probe zu erhalten. Die bearbeiteten Bilder, sowie gegebenenfalls die Höhenprofile des Xanthans wurden im JPEG-Format oder als Bitmap-Dateien gespeichert, um sie unter anderem im Programm Easyworm weiterverwenden zu können.

Im Programm Easyworm 1 konnten die Bitmap-Dateien genutzt werden, um die Kontur der einzelnen Stränge anzufitten (vgl. Abbildung 10). In Easyworm 2 wurden die strukturellen und mechanischen Parameter (Persistenz-, sowie die Konturlängen der verschiedenen Xanthanarten) anhand der in Easyworm 1 aufgenommenen Daten bestimmt. Für jede Probe wurde der Gesamtmittelwert aus allen gemessenen Einzelsträngen ermittelt. Für das pyruvatfreie Xanthan konnten nur einige wenige Polymere mit dieser standardisierten Auswertung untersucht werden, da dessen Struktur in vielen Fällen eine korrekte Berechnung der Persistenz- und Konturlänge mit Easyworm nicht zuließ. Für diese Polymere wurden strukturelle Auffälligkeiten einzeln herausgearbeitet und diskutiert.

Im Statistikprogramm R wurde die Verteilung der Höhenmittelwerte, die Verteilung der Mittelwerte der Konturlänge der einzelnen Stränge sowie die Verteilung der Mittelwerte der Persistenzlänge einer Probe mittels eines Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Da nur in wenigen Fällen eine Normalverteilung vorlag, wurde ein U-Test nach Mann-Whitney (nicht-parametrisch) durchgeführt, um signifikante Unterschiede in den Verteilungen zwischen den verschiedenen Xanthanarten zu finden. Die Signifikanzgrenze wurde standardmäßig auf $\alpha = 5\%$ gesetzt.

Um herauszufinden ob eine Verbindung zwischen der Konturlänge und der Viskosität, der Persistenzlänge und der Viskosität und der Höhe und der Viskosität besteht wurden Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizienten (r_s) für die Daten berechnet. Desweiteren wurden für die Höhenverteilung und die Verteilung der Konturlängen der Xanthanarten Histogramme sowie Boxplots erstellt.

Angegebene Werte in dieser Arbeit sind der errechnete Mittelwert \pm Standardabweichung.

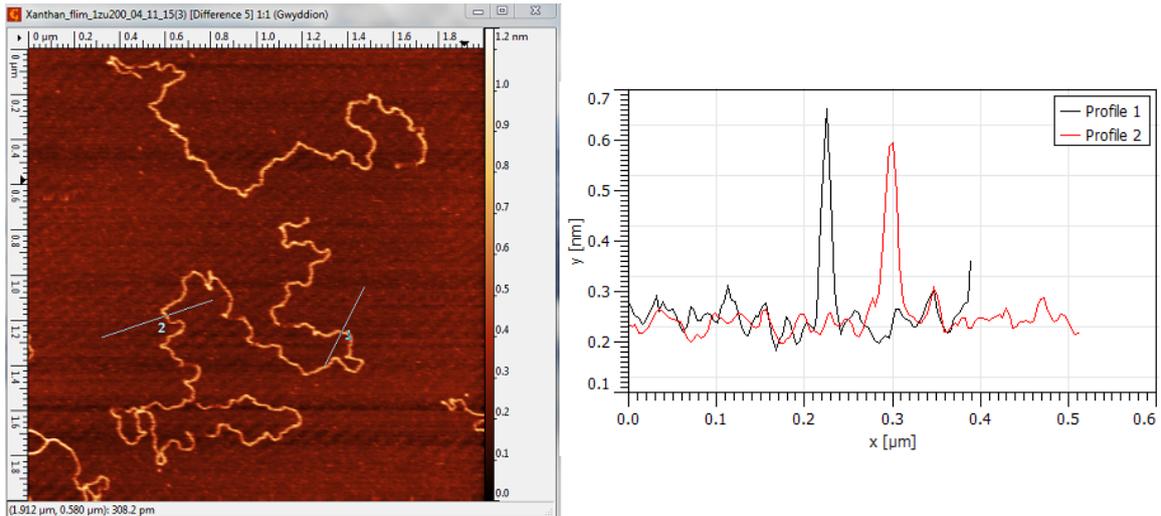


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung der Höhenmessung an zwei Stellen eines einzeln liegenden Strangs in Gwyddion. Links: AFM-Bild mit Höhenlinien. Rechts: Höhenprofile an den im linken Bild gemessenen Stellen. Die schwarze Kurve steht für die Höhenlinie mit Kennung „1“, die rote Kurve für die Höhenlinie mit Kennung „2“. Der Strang mit Kennung „1“ hat eine Höhe von 0,44nm, der Strang mit Kennung „2“ eine Höhe von 0,35 nm.

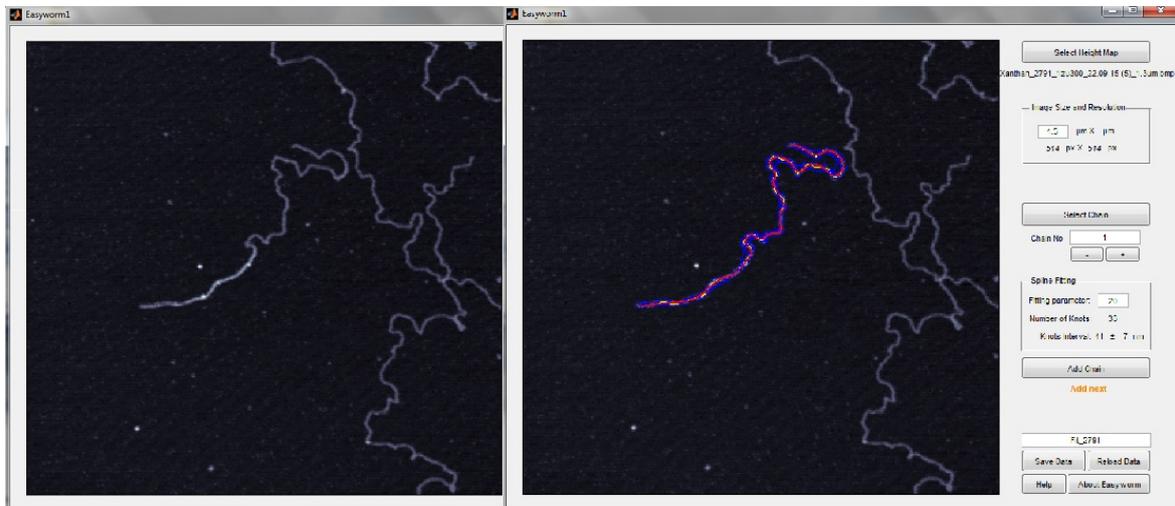


Abbildung 10: Prinzip des Anfittens im Programm Easyworm 1. Links: Rasterkraftmikroskopiebild eines einzeln liegenden Strangs von Xanthan. Rechts: Mithilfe von Easyworm 1 erstellter Fit der Kontur des Stranges.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Xanthan JBL007

Das Xanthan JBL007 wurde von einem Ausgangsstamm des Bakteriums *X. campestris*, welcher durch Selektion auf die Xanthanproduktion entstand, synthetisiert.

Die exkretierten Xanthanstränge (s. Abbildung 11) hatten einen Höhenmittelwert von $\bar{x} = 0.30 \text{ nm} \pm 0.06 \text{ nm}$ ($n = 16$) (s. Abbildung 12). Anhand des Histogramms lässt sich erkennen, dass die Höhe der Probe sehr homogen war, da die Variationsbreite nur 0.17 nm betrug (flachster Strang: 0.22 nm und höchster Strang: 0.39 nm). Ungefähr ein Drittel der Stränge der Probe lagen mit ihrer Höhe im Bereich zwischen 0.20 nm und 0.25 nm. Die anderen zwei Drittel teilten sich auf den Bereich zwischen 0.25 nm und 0.40 nm auf. Aufgrund der Höhe der Stränge ist davon auszugehen, dass die Polymere der Probe JBL007 überwiegend als Einzelstränge vorlagen. Nur an manchen Bereichen (z.B. markierter Bereich in Abbildung 11) war ein deutlich höherer Abschnitt eines Strangs erkennbar. Der Strang erscheint sehr flexibel und in einigen Fällen auf sich zurückgefaltet zu sein. Der erhöhte Bereich in Abbildung 11 lag bei etwa 1.4 nm, während der restliche Strang eine ungefähre Höhe von 0.35 nm hatte.

Die Konturlänge der Probe lag bei $\bar{x} = 2453 \text{ nm} \pm 2189 \text{ nm}$ ($n = 16$), wobei der längste Strang eine Länge von 7978 nm und der kürzeste nur eine Länge von 271 nm aufwies. Die Probe lag von den gemessenen Proben im oberen Bereich der Konturlängen. Die hohe Standardabweichung lässt auf die hohe Variabilität der Stranglängen schließen. Die Polymere werden von *X. campestris* dementsprechend in Bezug auf die Länge sehr inhomogen synthetisiert und exkretiert, was für Polysaccharide wie Xanthan normal ist (Van der Maarel, 2008 (S.10)). Die Persistenzlänge der Probe lag im Mittel bei $\bar{x} = 33 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ ($n = 16$) und damit im unteren Bereich der Persistenzlängen aller gemessenen Proben. Dies ist in Übereinstimmung mit den gemessenen Höhen der Stränge. Da in der Probe überwiegend Einzelstränge vorlagen, war eine geringe Persistenzlänge zu erwarten. Ein Einzelstrang hat aufgrund seiner Flexibilität mehr Freiheitsgrade als doppelsträngige Polymere. Eine geringe Persistenzlänge weist so auf eine geringere Steifigkeit des Moleküls hin. Auch die in Abbildung 11 erkennbaren höheren Stellen innerhalb eines Polymers (ein Pfeil markiert den Bereich) lassen sich auf diese Weise erklären. Ein von *X. campestris* exkretierter Einzelstrang, der bei geringer Persistenzlänge gleichzeitig eine hohe Konturlänge aufweist, bildet mit höherer Wahrscheinlichkeit enge Schlaufen, als ein doppelsträngiges Polymer mit hoher Persistenzlänge.

Bei einem doppelsträngigen Polymer wäre die Wahrscheinlichkeit einer in sich homogenen Höhe größer, da die Bewegungen des steiferen Polymers eingeschränkt wären (Abbildung 13) und es so seltener zur Schlaufenbildung kommt. Das markierte Polymer in Abbildung 13 wies einen einzelsträngigen Bereich (Höhe ungefähr 0.31 nm) mit relativ geringer Persistenzlänge ($L_p = 35$ nm) auf, während das letzte Stück einen Doppelstrang (Höhe ungefähr 0.67 nm) bildete. Der Doppelstrang hatte eine höhere Persistenzlänge ($L_p = 80$ nm) als der einzelsträngige Bereich. Darüberhinaus bildete der doppelsträngige Bereich keine Schlaufen, wohingegen das Polymer in seinem einzelsträngigen Bereich aufgrund der geringeren Steifigkeit deutlich häufiger Windungen (hier, wie auch im folgenden nicht zu verwechseln mit den helikalen Windungen) aufwies.

Bei Messungen der Viskosität des Xanthans JBL007 (1% Lösung) (Steffens, 2015, unpubliziert), wurde bei einer Scherrate von etwa 0.2 s^{-1} eine Viskosität von 15090 mPas ermittelt. Im Gegensatz zu hohen Schergeschwindigkeiten (bei einer Scherrate von 56 s^{-1} wurde eine Viskosität von 210 mPas gemessen), ist die Viskosität des Xanthans bei geringen Schergeschwindigkeiten deutlich höher.

Die Probe JBL007 lag mit hoher Wahrscheinlichkeit überwiegend einzelsträngig vor, wobei sich die Einzelstränge aufgrund ihrer geringen Steifigkeit immer wieder überkreuzten. Einige höhere Bereiche der Probe sind aufgrund der sonst vorliegenden Homogenität der Höhe vermutlich auf Überlagerungen oder Zurückfaltung des Strangs zurückzuführen, was durch die geringe Persistenzlänge möglich wird. Verzweigungen der Polymere traten nicht auf, es lagen ausschließlich Überkreuzungen und Überlagerungen vor. Die Probe wies bei geringen Schergeschwindigkeiten eine höhere Viskosität auf als bei hohen Schergeschwindigkeiten.

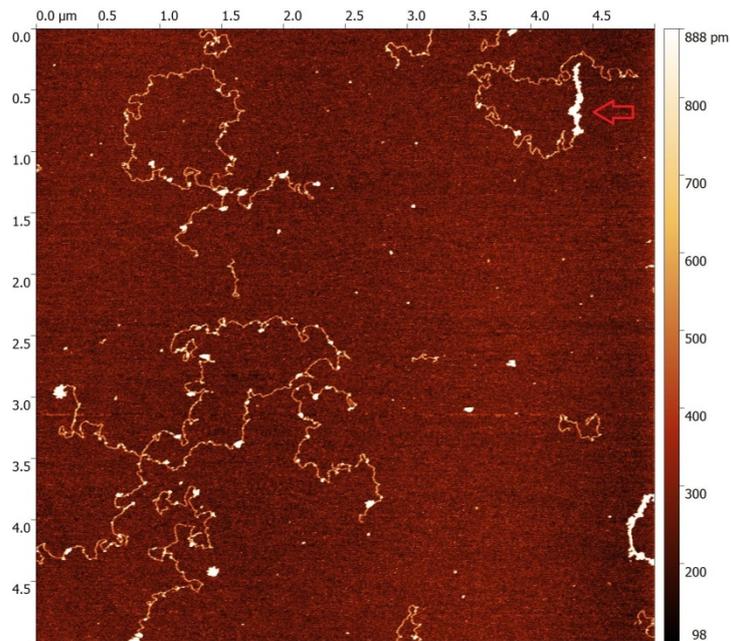


Abbildung 11: Rasterkraftmikroskopisches Übersichtsbild (5x5 µm) der Probe JBL007. Die Höhe der Polymere ist durch die Skala farbcodiert. Der rote Pfeil markiert den erhöhten Bereich eines Strangs, welcher eine Höhe von 1.4 nm aufweist. Der restliche Strang hat eine Höhe von 0.35 nm.

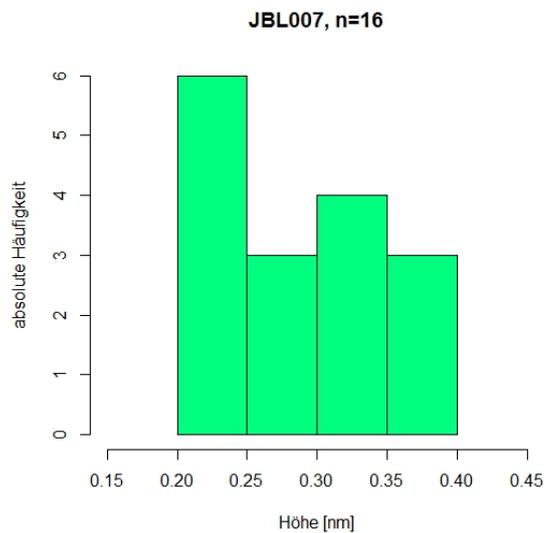


Abbildung 12: Histogramm der Höhen der Einzelstränge aus der Probe JBL007 (n = 16). Aufgetragen ist die Höhe der Stränge auf der X-Achse, sowie die Anzahl der Stränge auf der Y-Achse.

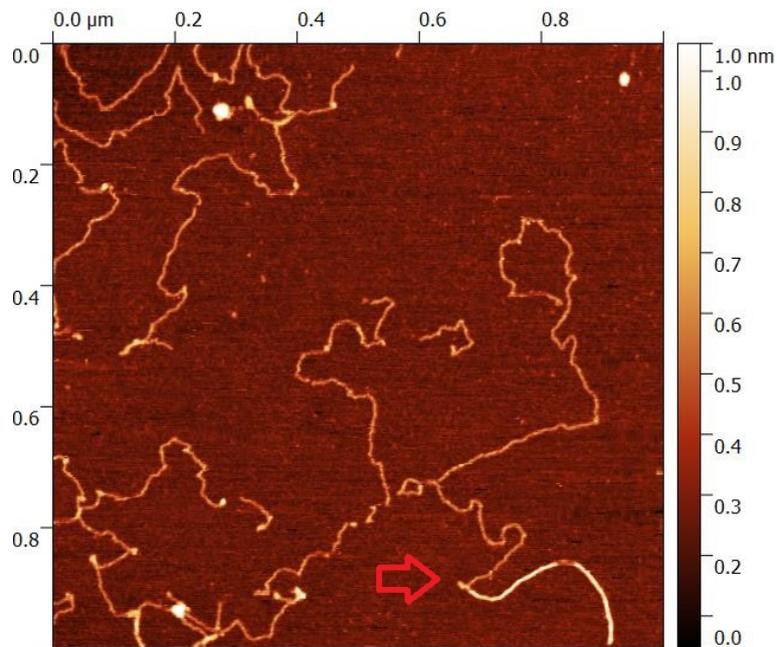


Abbildung 13: Rasterkraftmikroskopisches Bild (1x1 µm) der Probe JBL007. Die Höhe der Strukturen ist durch die Skala farbcodiert. Der mit einem roten Pfeil markierte Strang weist sowohl einen einzelsträngigen (Höhe 0.31 nm), als auch einen doppelsträngigen Bereich (Höhe 0.67 nm) auf. Der doppelsträngige Bereich hat mit 80 nm eine mehr als doppel so hohe Persistenzlänge wie der einzelsträngige Bereich ($L_p= 80$ nm).

4.2 Xanthan iFliC

Das Xanthan iFliC stammte von einem Mutationsstamm des *X. campestris* Stammes JBL007. Dem Bakterium fehlt das Protein Flagellin, welches ein Hauptbestandteil der bakteriellen Flagelle ist. Dementsprechend fehlt dem *X. campestris* Stamm iFliC die Flagelle. Die exakte Molekularstruktur des Xanthans dieses Stammes ist im Gegensatz zum Xanthan des Stammes JBL007 unbekannt, da nicht bekannt ist, inwieweit die Mutation im Genom des Bakteriums Auswirkungen auf das synthetisierte Xanthan und dessen Struktur hat.

Die Xanthanstränge der Probe iFliC (s. Abbildung 14) hatten eine mittlere Höhe von $\bar{x} = 0.32 \text{ nm} \pm 0.08 \text{ nm}$ ($n = 16$) (s. Abbildung 15). Damit lag die mittlere Höhe nur um 0.02 nm höher als bei JBL007. Die Variationsbreite von iFliC war aber fast doppelt so groß wie die von JBL007, sie lag bei 0.32 nm (flachster gemessener Strang: 0.18 nm und höchster Strang: 0.50 nm). Die meisten der gemessenen Stränge ($n = 13$) lagen im Bereich zwischen 0.2 nm und 0.4 nm. Nur wenige Stränge ($n = 3$) lagen darunter bzw. darüber (vgl. Abbildung 15). Auch bei iFliC ist davon auszugehen, dass das Xanthan aufgrund der Höhe der Stränge größtenteils als Einzelstrang vorlag.

Die mittlere Konturlänge betrug $\bar{x} = 1429 \text{ nm} \pm 1527 \text{ nm}$ ($n = 16$), der längste Strang war 4843 nm und der kürzeste 173 nm lang. Die mittlere Konturlänge der Probe lag im unteren Bereich der Konturlängen aller gemessenen Xanthanproben, wobei die hohe Standardabweichung hier ebenfalls die Variabilität der Stranglängen verdeutlicht. Die Proben JBL007 und iFliC waren sich in ihrer Höhe und der Variabilität der Stranglängen sehr ähnlich. Der Unterschied lag in der Konturlänge, welche bei iFliC im Mittel deutlich geringer war. Die mittlere Persistenzlänge betrug $\bar{x} = 37 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ ($n = 16$). Die geringe Persistenzlänge ist erneut in Übereinstimmung mit den errechneten Höhenwerten der Xanthanstränge, da Einzelstränge in ihren Bewegungsmöglichkeiten flexibler sind und aus diesem Grund eine geringe Steifigkeit aufweisen. Die geringe Steifigkeit ließ sich an den Strängen der Probe schon visuell gut erkennen (vgl. Abbildung 16). Das Polymer in Abbildung 16 weist in geringen Abständen Windungen von 90 Grad und mehr auf, wodurch man auf die geringe Persistenzlänge (etwa 30 nm) schließen kann.

Die gemessene Viskosität des iFliC Xanthans (1% Lösung) lag über der Viskosität des Xanthans JBL007, was besonders bei einer geringen Schergeschwindigkeit deutlich wurde. iFliC wies eine Viskosität von 26170 mPas bei einer Scherrate von etwa 0.2 s^{-1} auf. Im Vergleich dazu hatte JBL007 nur eine Viskosität von 15090 mPas bei gleicher Scherrate (Steffens, 2015, unpubliziert).

Das Xanthan der Probe iFliC lag überwiegend als Einzelstrang vor und wies eine geringe Steifigkeit (geringe Persistenzlänge) auf. Höhere Bereiche in Windungen des Polymers lassen sich durch die erkennbare Schlaufenbildung erklären, die aufgrund der geringen Persistenzlänge möglich ist. Wie auch bei der Probe JBL007 lag iFliC ausschließlich ohne Verzweigungen vor, es traten nur Überkreuzungen auf. Die Viskosität war mit 26170 mPas bei einer Scherrate von 0.2 s^{-1} recht hoch.

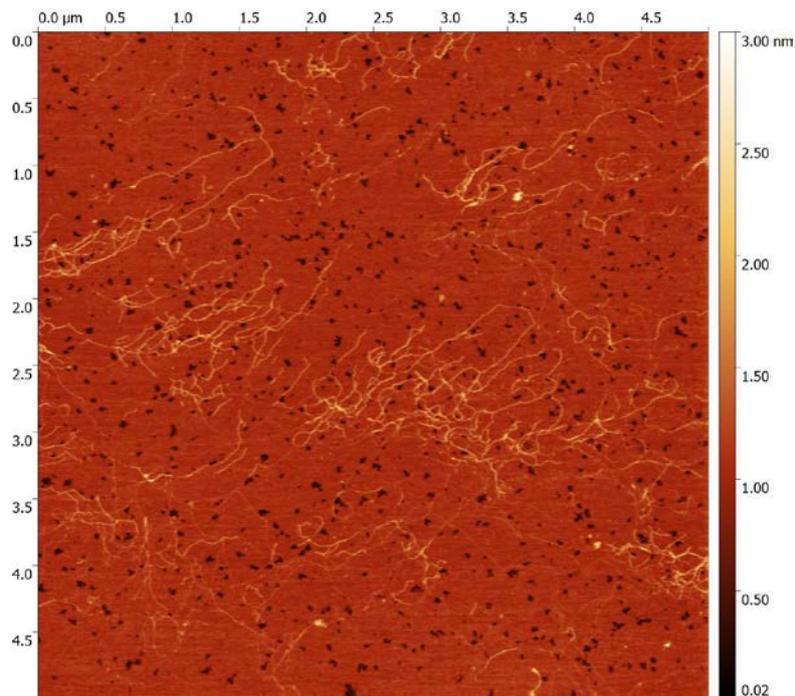


Abbildung 14: Rasterkraftmikroskopisches Übersichtsbild (5x5 µm) der Probe iFliC. Die Höhe der Stränge ist durch die Skala farbcodiert.

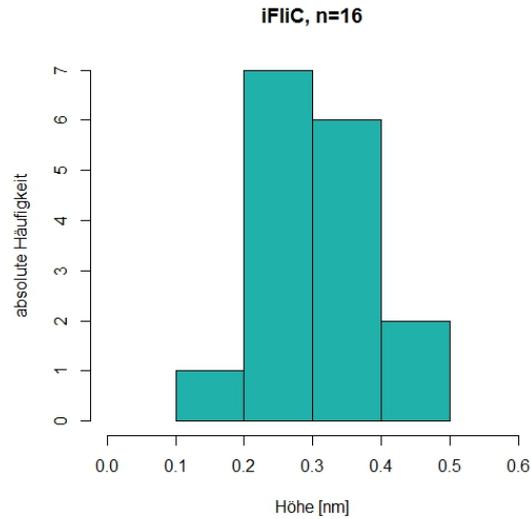


Abbildung 15: Histogramm der Höhen der Einzelstränge aus der Probe iFlIC (n=16). Aufgetragen ist die Höhe der Stränge auf der X-Achse, sowie die Anzahl der Stränge auf der Y-Achse.

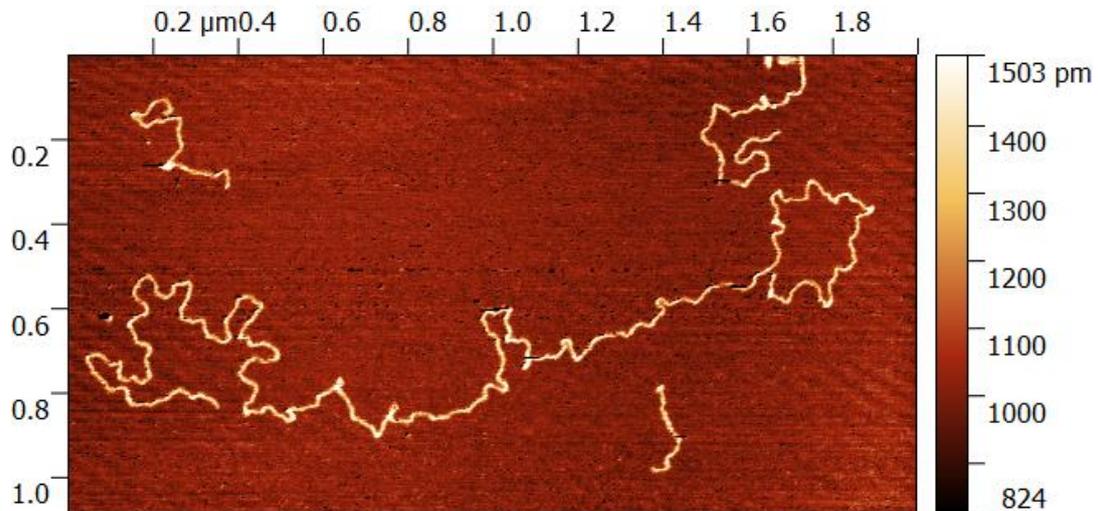


Abbildung 16: Rasterkraftmikroskopisches Bild (1x2 µm) der Probe iFlIC. Die Höhe der Strukturen ist durch die Skala farbcodiert. Es ist erkennbar, dass der Einzelstrang eine geringe Persistenzlänge (30 nm) aufweist.

4.3 Xanthan iFliM

Im Gegensatz zum Bakterienstamm iFliC, fehlt dem *X. campestris* Stamm iFliM nicht nur die Flagelle. Aufgrund einer Mutation fehlt den Bakterien zusätzlich auch der Basalapparat. Wie bei iFliC ist die exakte Molekularstruktur des synthetisierten Xanthans iFliM unbekannt.

Die Probe iFliM (s. Abbildung 17) hatte eine mittlere Höhe von $\bar{x} = 0.38 \text{ nm} \pm 0.14 \text{ nm}$ ($n = 21$) (s. Abbildung 18). Sie lag von den gemessenen Proben im mittleren Bereich der Höhen. Die Variationsbreite war mit 0.6 nm sehr hoch, wobei der flachste Strang eine Höhe von 0.16 nm erreichte und der höchste 0.76 nm. Ein Großteil der gemessenen Stränge hatte eine Höhe zwischen 0.2 nm und 0.6 nm ($n = 17$), nur vier Stränge lagen ober- und unterhalb dieses Bereichs (vgl. Abbildung 18). Aufgrund der Höhenverteilung kann davon ausgegangen werden, dass das Xanthan der Probe iFliM sowohl einzel- als auch in einigen wenigen Fällen doppelsträngig vorlag. Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Proben JBL007 und iFliC, kamen bei iFliM zum ersten Mal Stranghöhen über 0.5 nm vor (vgl. Abbildung 19). Das markierte Polymer in Abbildung 19 hatte eine Höhe von 0.8 nm, während die restlichen Stränge eine mittlere Höhe von 0.4 nm aufwiesen. Der Höhenmittelwert von 0.38 nm lässt darauf schließen, dass in der Probe aber mehr Einzel- als Doppelstränge vorlagen.

Die Konturlänge der Probe betrug im Mittel $\bar{x} = 2764 \text{ nm} \pm 2287 \text{ nm}$ ($n = 21$), womit iFliM die größte Konturlänge aller gemessenen Proben besaß. Auch hier lässt die hohe Standardabweichung die Variabilität der Stranglängen innerhalb der Probe erkennen. Der kürzeste Strang wies eine Länge von 391 nm auf, der längste war 7859 nm lang. Die Persistenzlänge lag bei $\bar{x} = 54 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ($n = 21$). Wie auch die Konturlänge war die Persistenzlänge von iFliM die größte aller gemessenen Proben. Doppelsträngiges Xanthan hatte dabei meist eine höhere Persistenzlänge als Einzelstränge (vgl. Abbildungen 18 und 19). Die markierten Doppelstränge in Abbildung 19, die die Form von Halbkreisen einnehmen, hatten eine Höhe von 0.8 nm und eine Persistenzlänge von etwa 67 nm, wohingegen die Einzelstränge eine Höhe 0.4 nm und eine Persistenzlänge von 38 nm aufwiesen.

Die von Steffens (2015, unpubliziert) gemessene Viskosität von iFliM (1% Lösung) lag bei einer Scherrate von etwa 0.2 s^{-1} bei 28760 mPas und damit in der Größenordnung der Viskosität von iFliC. Wie auch bei JBL007 und iFliC war die Viskosität bei niedrigen Schergeschwindigkeiten besonders hoch.

Die Probe iFliM lag sowohl einzel- als auch in wenigen Fällen doppelsträngig vor, wobei die Anzahl der Einzelstränge überwiegte, was sich in der mittleren Höhe von 0.38 nm widerspiegelt. Für die noch relativ geringe Höhe wies die Probe eine relativ hohe Persistenzlänge bei ebenfalls hoher Konturlänge auf. Die Stränge waren nicht verzweigt, sie lagen nur gewunden und überkreuzt vor. Die Viskosität des gelösten Xanthans war mit 28760 mPas (bei 0.168 s^{-1} Scherrate) recht hoch.

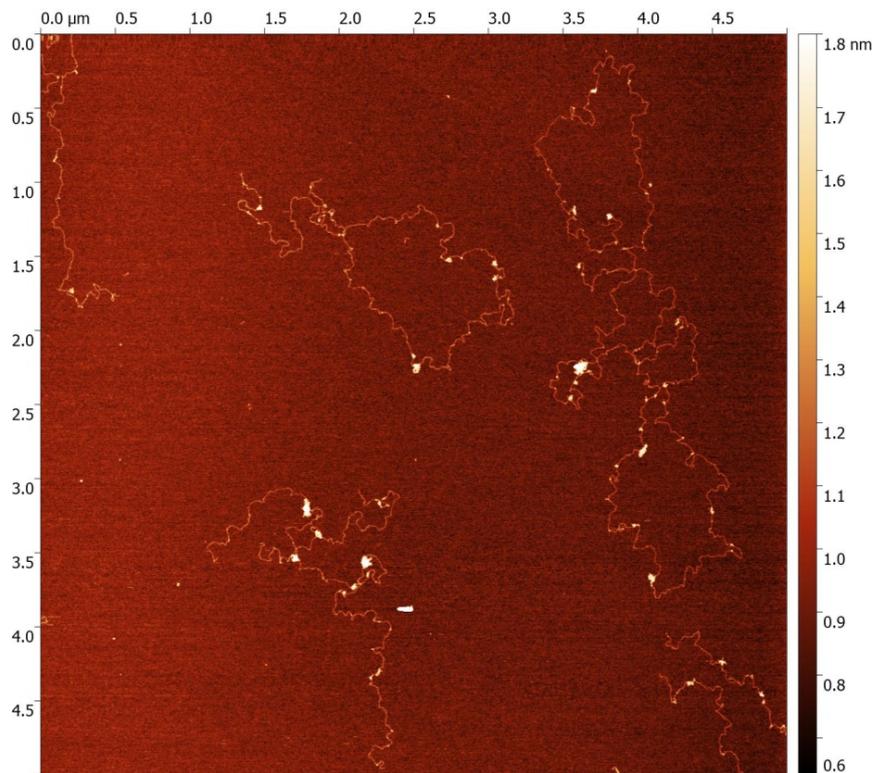


Abbildung 17: Rasterkraftmikroskopisches Übersichtsbild (5x5 µm) der Probe iFliM. Die Höhe der Polymere ist durch die Skala farbcodiert.

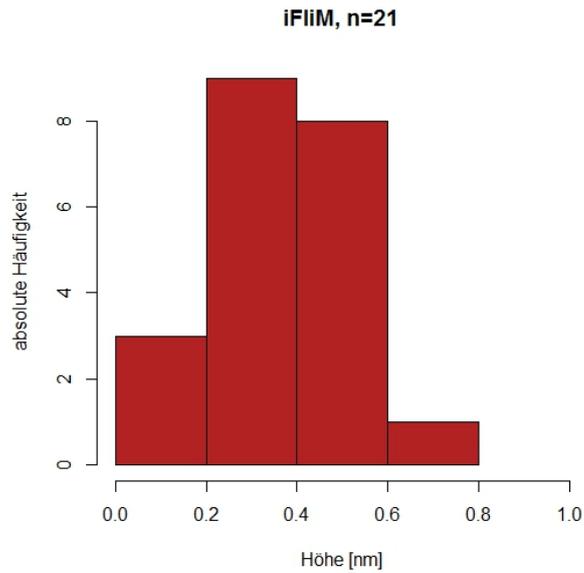


Abbildung 18: Histogramm der Höhen der Einzelstränge aus der Probe iFlIM (n=21). Aufgetragen ist die Höhe der Stränge auf der X-Achse, sowie die Anzahl der Stränge auf der Y-Achse.

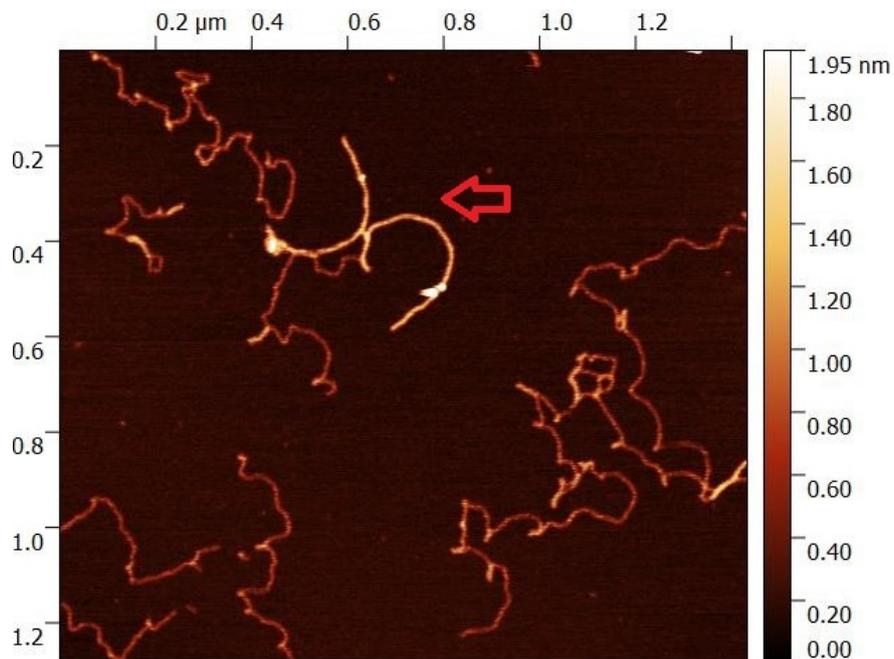


Abbildung 19: Rasterkraftmikroskopisches Bild ($1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$) der Probe iFlIM. Die Höhe der Strukturen ist durch die Skala farbcodiert. Zu erkennen sind zwei mit einem Pfeil markierte Doppelstränge (Höhe: 0.8 nm) mit hoher Persistenzlänge (67 nm) und einige (nicht markierte) Einzelstränge mit einer mittleren Höhe von 0.4 nm und einer Persistenzlänge von 38 nm.

4.4 Xanthan i2791

Der Bakterienstamm i2791 von *X. campestris* weist eine unbekannt Mutation auf. Die Mutation tritt im Gen 2791 des Genoms auf, das Produkt der Proteinbiosynthese für dieses Gen ist unbekannt. Aus diesem Grund ist auch der Phänotyp des *X. campestris* Stammes i2791, sowie die exakte Molekularstruktur des Xanthans nicht bekannt.

Das Xanthan der Probe i2791 (s. Abbildung 20) wies eine mittlere Höhe von $\bar{x} = 0.42 \text{ nm} \pm 0.07 \text{ nm}$ ($n = 15$) auf (vgl. Abbildung 21). Die Variationsbreite war mit 0.27 nm relativ gering. Der flachste Strang hatte eine Höhe von 0.32 nm, der höchste war 0.59 nm hoch. Etwa die Hälfte der Stränge der Probe ($n = 7$) lagen bei einer Höhe zwischen 0.36 nm und 0.42 nm. Die restlichen Stränge ($n = 8$) teilten sich auf die Bereiche darunter und darüber auf. Sechs Stränge lagen zwischen 0.42 nm und 0.6 nm. Die Xanthanstränge der Probe i2791 lagen vermutlich als Einzel- sowie in sehr geringem Maße als Doppelstränge vor. Wie bei iFliM ist aber davon auszugehen, dass der größte Teil der Polymere noch als Einzelstränge vorlagen, was sich am Histogramm erkennen lässt (s. Abbildung 21).

Die Konturlänge betrug $\bar{x} = 2008 \text{ nm} \pm 1621 \text{ nm}$ ($n = 14$). Aufgrund der Verzweigung eines Xanthanstrangs musste dieser für die Auswertung der Kontur- und Persistenzlänge ausgelassen werden, weshalb in die Berechnung nur 14 Polymere eingingen. Die Länge der Stränge war sehr variabel, was sich erneut an der hohen Standardabweichung erkennen lässt. Der kürzeste Strang wies eine Länge von 359 nm, der längste von 6130 nm auf. Die Persistenzlänge lag bei $\bar{x} = 22 \text{ nm} \pm 9 \text{ nm}$ ($n = 14$), was den kleinsten Wert der gemessenen Proben ausmacht. Aufgrund der wahrscheinlich hohen Anzahl an Einzelsträngen (geringe Höhe der Stränge) die in der Probe vorlagen, war die geringe Persistenzlänge erneut in Übereinstimmung mit den gemessenen Höhen.

Für das Xanthan des *X. campestris* Stammes i2791 liegen keine Viskositätswerte vor.

Das Xanthan i2791 lag höchstwahrscheinlich zu einem großen Teil als Einzelstrang vor, nur ein sehr kleiner Teil konnte den Doppelsträngen zugeordnet werden. Die Probe wies eine geringe Persistenzlänge und eine hohe Konturlänge auf. Es traten erneut fast nur Überkreuzungen und Knicke auf, nur in einem Fall kam es zu einer Verzweigung eines Xanthanstrangs.

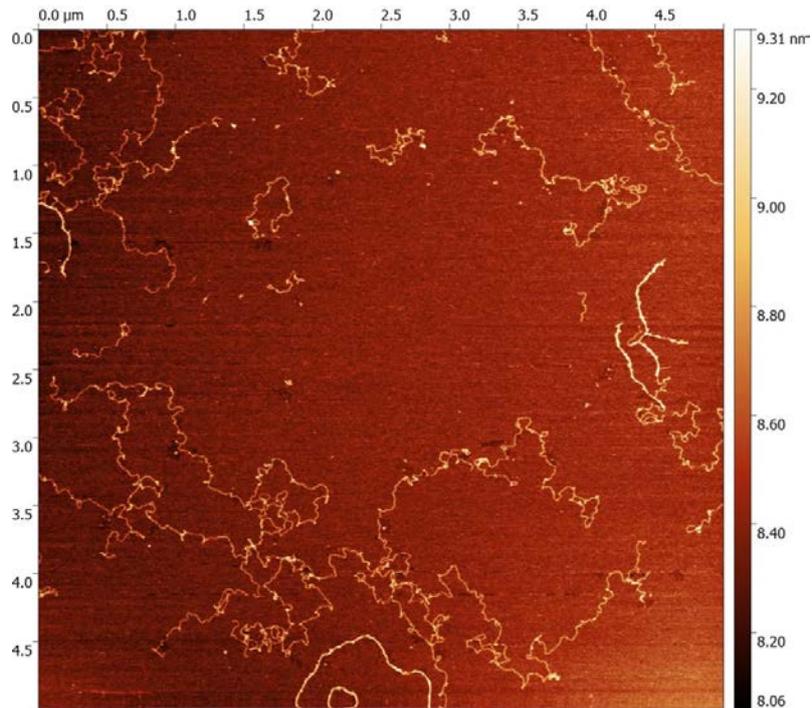


Abbildung 20: Rasterkraftmikroskopisches Übersichtsbild (5x5 µm) der Probe i2791. Die Höhe der Stränge ist durch die Skala farbcodiert.

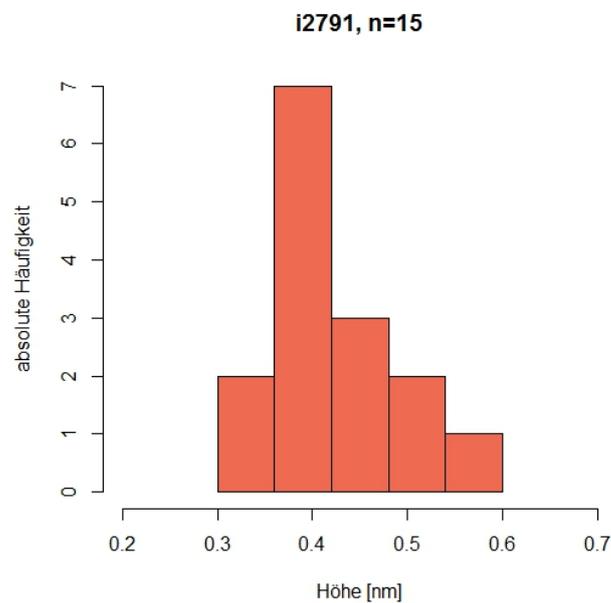


Abbildung 21: Histogramm der Höhen der Einzelstränge aus der Probe i2791 (n=15). Aufgetragen ist die Höhe der Stränge auf der X-Achse, sowie die Anzahl der Stränge auf der Y-Achse.

4.5 Acetatfreies Xanthan

Der *X. campestris* Stamm, welcher das acetatreie Xanthan produziert, weist eine Mutation im Genom auf, durch welche dem synthetisierten Xanthan der Acetylrest an einer Mannoseseitenkette fehlt (vgl. Abb 1). Die Mutation wirkt nicht direkt auf den Phänotyp des Bakteriums, sondern auf den Syntheseweg des Xanthans, so dass das synthetisierte Xanthanmolekül keine Acetylgruppe besitzt.

Das acetatfreie Xanthan (s. Abbildung 22) besaß eine mittlere Höhe von $0.44 \text{ nm} \pm 0.12 \text{ nm}$ ($n = 30$) (s. Abbildung 23), womit es eine der größten mittleren Höhen aller gemessenen Proben einnahm. Die Variationsbreite lag mit 0.34 nm im mittleren Bereich. Der flachste Strang hatte eine mittlere Höhe von 0.28 nm , der höchste eine Höhe von 0.62 nm . Ein Drittel ($n = 10$) der Polymere hatte eine Höhe zwischen 0.3 nm und 0.4 nm . Insgesamt neun Stränge wiesen eine Höhe über 0.5 nm auf (vgl. Abbildung 23). Das acetatfreie Xanthan lag aufgrund der Höhenverteilung der Stränge vermutlich überwiegend einzelsträngig, als auch zu einem geringen Anteil doppelsträngig vor. Manche Stränge wiesen – wie schon in den anderen Proben erkennbar – gleichzeitig sowohl einzel-, als auch doppelsträngige Bereiche auf (s. Abbildung 24). Das Polymer in Abbildung 24 erreichte auf einer Hälfte eine Höhe von 0.35 nm , die andere Hälfte erreichte eine Höhe von 0.8 nm . Wie auch bei den anderen Proben ist der Zusammenhang zwischen Persistenzlänge und Höhe konsistent. Der einzelsträngige Bereich (0.35 nm hoch) des Xanthansstranges hatte eine Persistenzlänge von 23 nm , der doppelsträngige Bereich (0.8 nm hoch) kam auf einen etwa fünfmal so hohen Wert ($L_P = 122 \text{ nm}$). Stränge die durchgehend einzelsträngig waren (s. Abbildung 25), wiesen deswegen bei geringer Höhe (0.35 nm) auch eine geringe Persistenzlänge auf (22 nm). Bei dem Strang in Abbildung 25 ist außerdem erkennbar, dass es aufgrund der geringen Persistenzlänge öfter zu Schlaufenbildung kommt, als es bei höherer Persistenzlänge eines Doppelstrangs (s. z.B. Abbildung 24) der Fall wäre.

Die Konturlänge der Probe betrug $\bar{x} = 1409 \text{ nm} \pm 1130 \text{ nm}$ ($n = 30$). Die gemessene Konturlänge war die kleinste aller gemessenen Proben. Aber auch hier spiegelt die hohe Standardabweichung die Variabilität der Stranglängen innerhalb einer Probe wider. Der kürzeste Strang hatte eine Länge von 315 nm , der längste von 5955 nm . Die Persistenzlänge lag mit $\bar{x} = 47 \text{ nm} \pm 11 \text{ nm}$ im mittleren Bereich. Dies war zu erwarten, da die Probe sowohl aus Einzel-, als auch aus Doppelsträngen bestand.

Die gemessene Viskosität des acetatfreien Xanthans (1% Lösung) lag bei einer Scherrate von 0.2 s^{-1} bei 12300 mPas (Steffens, 2015, unpubliziert). Damit lag die Viskosität in etwa in der Größenordnung des Xanthans JBL007. Dies ist in Übereinstimmung mit den von Callet et al. (1987) publizierten Daten zur Viskosität acetatfreien Xanthans. Die Deacetylierung des Xanthans hatte weder einen Einfluss auf dessen intrinsische Viskosität, noch auf die Viskosität des Xanthans in Lösung.

Das acetatfreie Xanthan lag vermutlich sowohl einzel- als auch in geringen Maßen doppelsträngig vor. Doppelsträngige Bereiche wiesen eine höhere Persistenzlänge auf als einzelsträngige Bereiche. Auch in dieser Probe traten keine Verzweigungen der einzelnen Stränge auf. Aufgrund der teilweise geringen Persistenzlänge kam es aber zu Überkreuzungen der Polymere. Die Viskosität war mit 12300 mPas bei einer Scherrate von 0.2 s^{-1} relativ gering.

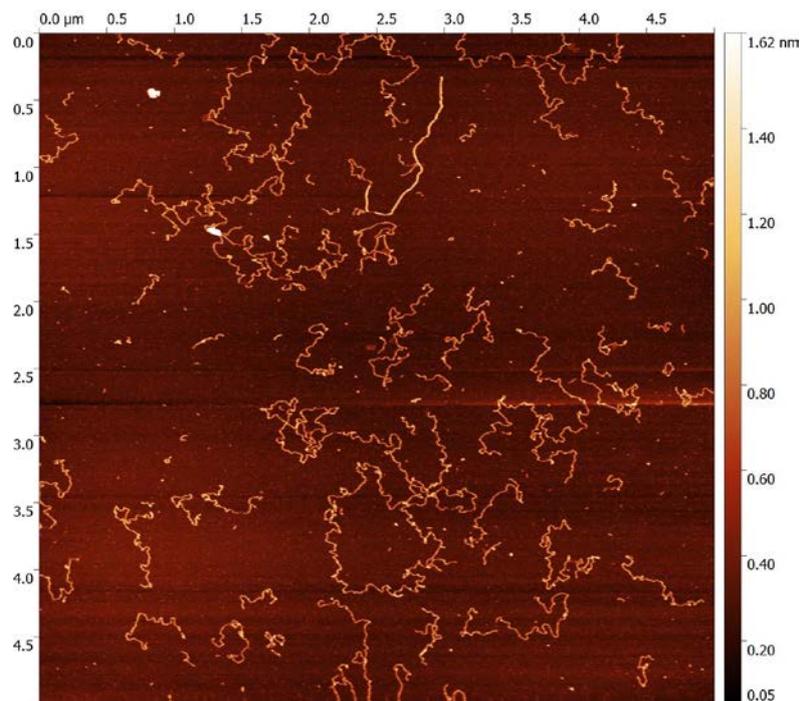


Abbildung 22: Rasterkraftmikroskopisches Übersichtsbild (5x5 µm) des acetatfreien Xanthans. Die Höhe der Stränge ist durch die Skala farbcodiert.

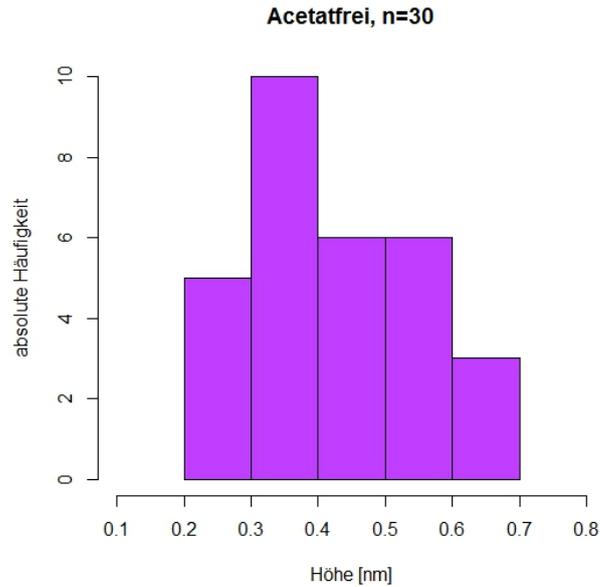


Abbildung 23: Histogramm der Höhen der Einzelstränge des acetatfreien Xanthans (n=30). Aufgetragen ist die Höhe der Stränge auf der X-Achse, sowie die Anzahl der Stränge auf der Y-Achse.

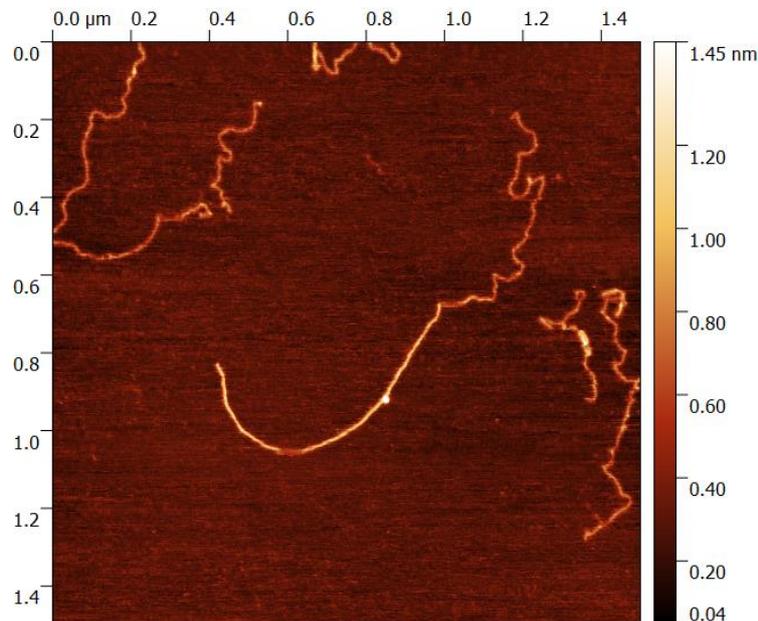


Abbildung 24: Rasterkraftmikroskopisches Bild (1.5x1.5µm) des acetatfreien Xanthans. Die Höhe der Strukturen ist durch die Skala farbcodiert. Zu erkennen ist ein Polymer, welches sowohl einen einzel- als auch einen doppelsträngigen Bereich aufweist. Die Höhe des doppelsträngigen Bereichs beträgt 0.8 nm, die Höhe des einzelsträngigen Bereichs 0.35 nm. Der doppelsträngige Bereich weist mit 122 nm eine mehr als fünfmal höhere Persistenzlänge auf als der einzelsträngige Bereich ($L_p = 23$ nm).

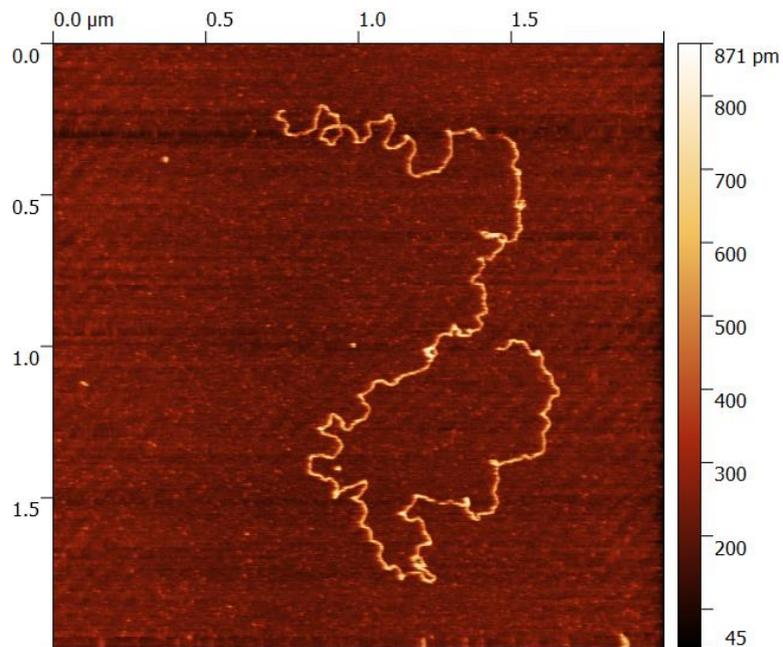


Abbildung 25: Rasterkraftmikroskopisches Bild (2x2µm) eines Einzelstrangs des acetatfreien Xanthans. Die Höhe der Strukturen ist durch die Skala farbcodiert. Der Strang weist eine Höhe von 0.35 nm und eine Persistenzlänge von 22 nm auf. Die Konturlänge beträgt 6782 nm.

4.6 Pyruvatfreies Xanthan

Analog zum acetatfreien Xanthan weist der *X. campestris* Stamm, welcher das pyruvatfreie Xanthan produziert, eine Mutation im Genom auf, durch welche dem synthetisierten Xanthan der Pyruvatrest an einer Mannoseseitenkette fehlt (vgl. Abb. 1). Auch hier wirkt die Mutation nicht direkt auf den Phänotyp von *X. campestris*, sondern auf die Xanthansynthese, sodass ein Xanthanmolekül ohne Pyruvatgruppe entsteht.

Da das pyruvatfreie Xanthan eine gänzlich andere Struktur aufwies als die anderen gemessenen Proben, konnte die Auswertung nicht auf die standardisierte Weise erfolgen. Im Gegensatz zu den fünf anderen untersuchten Xanthanarten traten beim pyruvatfreien Xanthan neben Überkreuzungen auch Verzweigungen innerhalb der einzelnen Polymere auf (s. Abbildung 26). Schon ohne die Höhen zu messen ist erkennbar, dass ein einzelnes Polymer an verschiedenen Stellen sehr unterschiedlich hoch sein kann (s. Abbildung 26). Aufgrund seiner Struktur war es nicht möglich, eine korrekte Konturlänge, sowie Persistenzlänge des Xanthans zu bestimmen. Für Polymere, die eine relativ homogene Höhe besaßen ($n = 5$ für Stränge höher als 0.5 nm und $n = 3$ für Stränge flacher als 0.5 nm), konnten die Mittelwerte für Höhe und Persistenzlänge bestimmt werden. Für die flachen Stränge war auch die Bestimmung der Konturlänge möglich, was aufgrund der Verzweigung bei den höheren Strängen nicht durchführbar war. In anderen Fällen (sehr inhomogene Höhe oder Verzweigung des Polymers) wurden anhand einiger strukturell auffälliger Stränge die probenspezifischen Merkmale herausgearbeitet.

Die flachen Stränge ($n = 3$) wiesen einen Höhenmittelwert von $\bar{x} = 0.31 \text{ nm} \pm 0.11 \text{ nm}$ auf, wohingegen die hohen Stränge ($n = 5$) mit einem Mittelwert von $\bar{x} = 0.63 \text{ nm} \pm 0.13 \text{ nm}$ etwa doppelt so hoch waren. In der Probe lagen also vermutlich Einzel- sowie Doppelstränge vor. Es ist erkennbar, dass die flacheren Stränge mehr Windungen hatten, die hohen Stränge dafür aber Verzweigungen aufwiesen (vgl. Abbildung 27 und 28 rechts).

Die Konturlänge der flachen Polymere ($n = 3$) betrug im Mittel $\bar{x} = 605 \text{ nm} \pm 366 \text{ nm}$, der längste der drei Stränge wies eine Höhe von 1009 nm auf. Für die hohen Polymere ($n = 5$) konnte die Konturlänge aufgrund der Verzweigungen der Stränge nicht bestimmt werden. Die Konturlänge ist, wie bei allen untersuchten Proben sehr variabel. Die Persistenzlänge nahm wie bei den anderen Xanthanarten aufgrund der Stranghöhen erwartete Werte an. Die flachen, gewundenen Stränge wiesen eine Persistenzlänge von $\bar{x} = 38 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ auf. Die hohen, verzweigten Stränge hingegen hatten eine größere Persistenzlänge, welche im Mittel bei $\bar{x} = 81 \text{ nm} \pm 17 \text{ nm}$ lag.

Neben den Polymeren mit durchgehend homogener Höhe gab es Stränge die sowohl einzel- als auch doppelsträngige Bereiche aufwiesen. Die Probe bestand zu einem Großteil aus Polymeren dieser Art. Es war auch hier zu erkennen, dass die höheren Bereiche eines Polymers im Gegensatz zu den flacheren Bereichen Verzweigungen aufwiesen. Die flachen Strangabschnitte zeigten aber mehr Windungen, welche in den höheren Bereichen fehlten (s. Abbildung 27 und 28 links). Augenscheinlich wiesen die flacheren Bereiche eine geringere Persistenzlänge auf als die höheren. Die Abstände in welchen die Stränge ihre Höhe änderten wirkte willkürlich. Die höheren Bereiche wiesen zusätzlich zu den Verzweigungen auch knotenähnliche Strukturen auf, die in unregelmäßigen Abständen vorkamen (s. Abbildung 26). Eventuell kommt es durch das Fehlen des Pyruvats zur Zurückfaltung des Polymers und so zur Bildung doppelsträngiger Bereiche.

Die Viskosität des pyruvatfreien Xanthans wich, wie auch seine Struktur, stark von der der anderen untersuchten Proben ab. Die Viskosität war mit 97650 mPas bei einer Scherrate von 0.2 s^{-1} mehr als sechsmal so groß wie die Viskosität des Ausgangsstammes JBL007. Das gelöste pyruvatfreie Xanthan wirkte in wässriger Lösung außerdem trüber als die anderen untersuchten Xanthanarten. Im Gegensatz zu der hier gefundenen negativen Korrelation zwischen dem Anteil an Pyruvat und der Viskosität des Xanthans (weniger Pyruvat führt zu höherer Viskosität) fanden Bradshaw et al. (1983), als auch Callet et al. (1987), dass der Pyruvatisierungsgrad des Xanthans keinen Einfluss auf dessen Viskosität besitzt. Die von Bradshaw et al. und Callet et al. genutzten Xanthanproben wurden chemisch verändert, so dass das Xanthan pyruvatfrei vorlag. Aus diesem Grund ist es schwierig das chemisch veränderte Xanthan direkt mit nativem Xanthan zu vergleichen, da durch die Abtrennung von Seitengruppen auch immer eine (geringe) Änderung des Molekulargewichts einhergeht (Callet et al., 1987). Bei dem in dieser Arbeit untersuchten pyruvatfreien Xanthan wurde keine chemische Änderung der Xanthanstruktur vorgenommen. Der *X. campestris* Stamm welcher das pyruvatfreie Xanthan exkretiert, weist eine Mutation auf, so dass die Pyruvatgruppe nicht extra chemisch entfernt werden musste. So entstehen je nach Art der Behandlung des Xanthans (chemische Abtrennung von Seitengruppen oder genetische Veränderung des *X. campestris* Stammes) eventuelle Unterschiede in der Viskosität.

Das pyruvatfreie Xanthan stellte die strukturell diverseste der sechs gemessenen Proben dar. Es lag sowohl einzel- als auch doppelsträngig vor. Die Polymere die in sich eine annähernd homogene Höhe besaßen konnten eingeteilt werden in Stränge die flacher als 0.5 nm waren, sowie welche die Höhen über 0.5 nm aufwiesen. Darüberhinaus kamen Stränge vor, die sowohl einzel- als auch doppelsträngig waren. Doppelsträngige Polymere waren verzweigt, die Einzelstränge wiesen aber engere Windungen auf. Die Viskosität des pyruvatfreien Xanthans war die mit Abstand höchste aller untersuchten Xanthanproben.

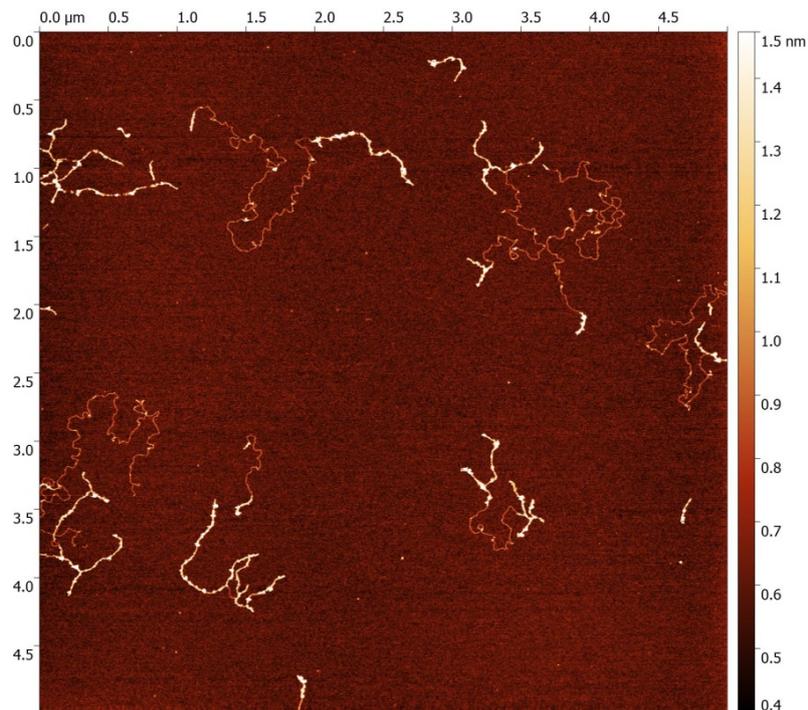


Abbildung 26: Rasterkraftmikroskopisches Übersichtsbild (5x5 µm) des pyruvatfreien Xanthans. Die Höhe der Stränge ist durch die Skala farbcodiert. In den höheren Bereichen (vermutlich Doppelstränge), welche im Bild weiß hervortreten, entstehen in gewissen Abständen knotenförmige Gebilde.

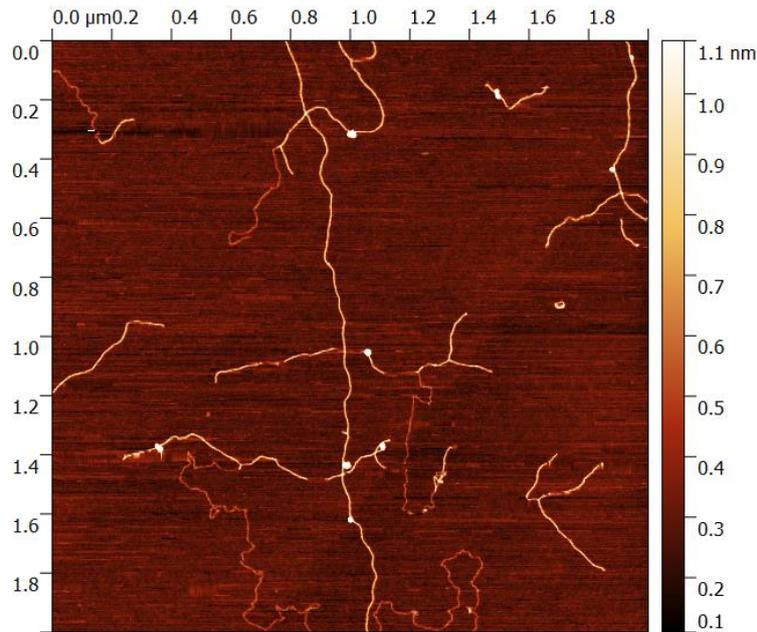


Abbildung 27: Rasterkraftmikroskopisches Bild (2x2 µm) des pyruvatfreien Xanthans. Die Höhe der Strukturen ist durch die Skala farbcodiert. Es ist erkennbar, dass höhere Bereiche der Xanthanstränge, welche höchstwahrscheinlich Doppelstränge darstellen, in unregelmäßigen Abständen ausdünnen und an diesen Stellen wahrscheinlich zu Einzelsträngen werden. Die dünneren Stränge sind außerdem gewundener, während die höheren Stränge anstatt Windungen eher Verzweigungen ihrer Polymerstruktur aufweisen.

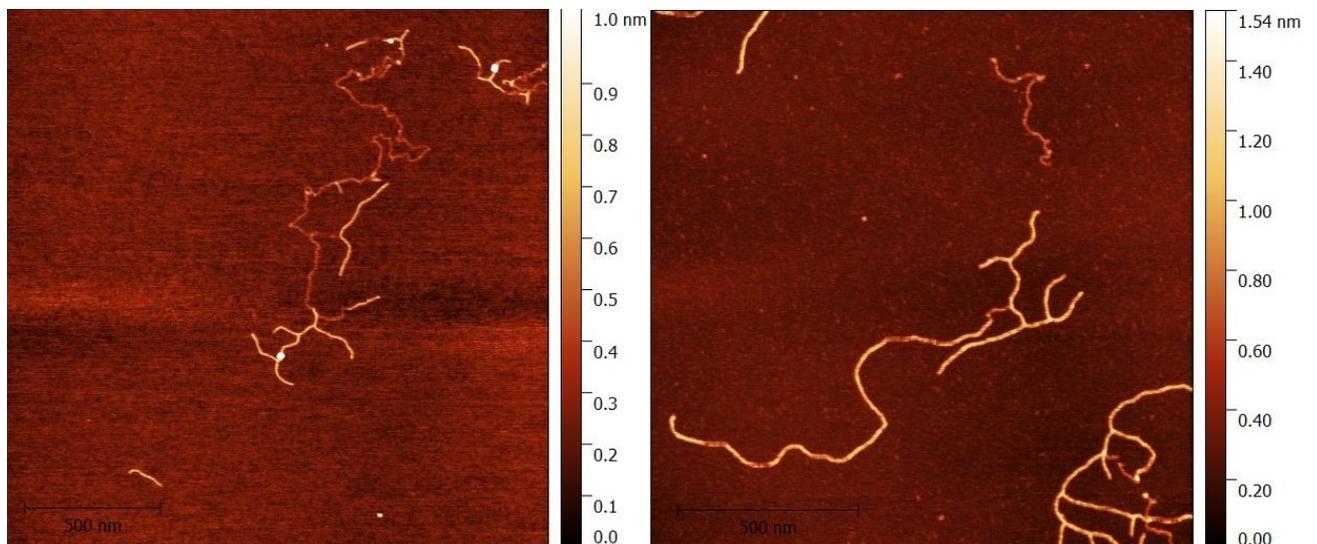


Abbildung 28: Rasterkraftmikroskopische Bilder des pyruvatfreien Xanthans. Die Höhe der Strukturen ist durch die Skala farbcodiert. Links: Ein einzelner Strang der sowohl flache als auch hohe Bereiche aufweist (Größe des Bildes 2x2 µm). Die flachen Bereiche zeigen mehr Windungen, die höheren Bereiche sind verzweigter. Rechts: Ein dünner, gewundener Strang (oben rechts im Bild) der eine Höhe von 0.4 nm aufweist und ein höherer Strang (Höhe 0.85 nm), welcher Verzweigungen aufweist. Der dünne Strang weist eine Persistenzlänge von 35 nm auf, der hohe Strang von 72 nm (Größe des Bildes 1.5x1.5 µm).

5. Vergleich der Proben

5.1 Übersicht

Die untersuchten Proben wiesen sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten in ihrer Struktur auf. Die aufgenommenen Daten der Proben sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefasst. Zur Auswertung der Strukturparameter und der Viskosität wurden U-Tests nach Mann-Whitney, sowie Korrelationen berechnet. In den folgenden Abschnitten sollen die Daten diskutiert werden.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Strukturdaten aller Proben. Für das pyruvatfreie Xanthan wurden nur die Stränge, die eine in sich homogene Höhe aufwiesen (n = 8) in die Tabelle aufgenommen. Angegeben für die Strukturdaten sind der Mittelwert \pm Standardabweichung in nm sowie die Viskosität in mPas.

	Höhe [nm]	Konturlänge [nm]	Persistenzlänge [nm]	Viskosität [mPas] (**)
JBL007 (n = 16)	0.30 \pm 0.06	2453 \pm 2189	33 \pm 4	15090
iFliC (n = 16)	0.32 \pm 0.08	1429 \pm 1527	37 \pm 5	26170
iFliM (n = 21)	0.38 \pm 0.14	2764 \pm 2287	54 \pm 10	28760
i2791 (*)	0.42 \pm 0.07	2008 \pm 1621	22 \pm 9	Fehlt
Acetatfrei (n = 30)	0.44 \pm 0.12	1409 \pm 1130	47 \pm 11	12300
Pyruvatfrei flach (n = 3)	0.31 \pm 0.11	605 \pm 366	38 \pm 5	97650
Pyruvatfrei hoch (n = 5)	0.63 \pm 0.13	Nicht bestimmbar	81 \pm 17	97650

(*) n = 15 für Höhe, n = 14 für L_P und L_C

(**) bei Scherrate 0.2 s⁻¹

Tabelle 3: Zusammenfassung der spezifischen Eigenschaften, welche jede der sechs Proben ausmachen.

Probe	Eigenschaften
JBL007	Einzelsträngig und flexibel, lang, geringe Viskosität
iFliC	Einzelsträngig und flexibel, relativ kurz, mittlere Viskosität
iFliM	Überwiegend einzelsträngig mit wenigen doppelsträngigen Anteilen, semiflexibel, lang, mittlere Viskosität
i2791	Überwiegend einzelsträngig mit wenigen doppelsträngigen Anteilen, flexibel, mittellang
Acetatfrei	Einzelsträngig und doppelsträngig (doppelsträngige Bereiche oft innerhalb der Einzelstränge), semiflexibel, relativ kurz, geringe Viskosität
Pyruvatfrei	Sowohl Einzelstränge als auch Doppelstränge, variierende Persistenzlänge (Doppelstränge: hohe L_p , Einzelstränge: geringe L_p), hohe Viskosität, Verzweigungen der Doppelstränge

5.2 Höhenprofil

Die Mittelwerte der Höhen der sechs Proben unterschieden sich, wenn auch teilweise nur geringfügig (s. Abbildung 29). Besonders gut war der Unterschied in der Höhe zwischen den Doppelsträngen des pyruvatfreien Xanthans und der Höhe der anderen Proben zu erkennen. Ein U-Test nach Mann-Whitney ergab für das acetatfreie Xanthan und das Xanthan des Ausgangsstammes JBL007 ein hochsignifikantes Ergebnis (p -Wert < 0.001). Auch für das acetatfreie Xanthan und das Xanthan des Stammes iFliC wurde mithilfe des U-Tests ein hochsignifikantes Ergebnis (p -Wert < 0.001) bestimmt. Für das pyruvatfreie Xanthan konnte aufgrund der geringen Stichprobengrößen ($n = 3$ und $n = 5$) kein U-Test berechnet werden. Die Kombinationen der anderen Xanthane ergaben p -Werte > 0.05 und unterschieden sich somit nicht signifikant.

Die signifikanten Ergebnisse zeigen, dass die Mutationen, welche direkt die chemische Struktur des Xanthans beeinflussen, den größten Einfluss auf die Höhen der Polymere haben. In der Probe des acetatfreien Xanthans lagen Polymere vor, welche doppelsträngige Bereiche aufwiesen, die die mittlere Höhe der Probe maßgeblich vergrößerten. Auch die hohen Stränge des pyruvatfreien Xanthans ($n = 5$) waren auf den Mikroskopiebildern in ihrer Höhe deutlich von den flacheren Strängen abgrenzbar (vgl. Höhenverteilung in Abbildung 29). Deshalb ist es denkbar, dass bei einer genügend großen Stichprobe des pyruvatfreien Xanthans ein U-Test ebenfalls signifikante Ergebnisse zwischen den hohen Strängen des pyruvatfreien Xanthans und dem Xanthan des Ausgangsstammes JBL007 ergeben würde. Die Abspaltung von Acetyl- bzw. Pyruvatgruppen wirkt sich eventuell auf die Möglichkeiten aus, mit denen das Molekül Bindungen eingehen kann. Durch die wegfallenden negativen Ladungen im Falle des Pyruvats könnte es zu weniger Abstoßungsreaktionen kommen, so dass eher Bindungen eingegangen werden. Dies ist aufgrund der noch vorhandenen Ladungen beim Xanthan des Ausgangsstammes JBL007 wahrscheinlich nicht möglich. Folglich kann es zur Bildung doppelsträngiger Polymere beim pyruvatfreien Xanthan kommen.

Die aufgestellte Hypothese (H_1) – Das acetatfreie Xanthan, sowie das pyruvatfreie Xanthan sind signifikant höher, als das des Ausgangsstammes JBL007 – kann aufgrund der Datenlage bestätigt werden. Die Xanthane unterschieden sich signifikant vom Xanthan JBL007, die Veränderung der molekularen Struktur des Xanthans wirkt sich mutmaßlich auf die Wahrscheinlichkeit aus, mit welcher das Xanthan Doppelstränge bildet. Durch die Entfernung von Ladungen an den Seitenketten werden Abstoßungsreaktionen abgeschwächt, wodurch Bindungen mit anderen Molekülen eingegangen werden können.

Die in der Einleitung erwähnte Energiehypothese in Bezug auf die Xanthane der *X. campestris* Stämme iFliC und iFliM trifft nicht auf das Höhenprofil der Proben zu. Die Höhen der Proben iFliC und iFliM unterschieden sich nicht signifikant (p-Wert > 0.05). Somit wirkt sich die Energieersparnis sehr wahrscheinlich auf andere strukturelle Parameter des Xanthans aus (vgl. Abschnitt 5.3).

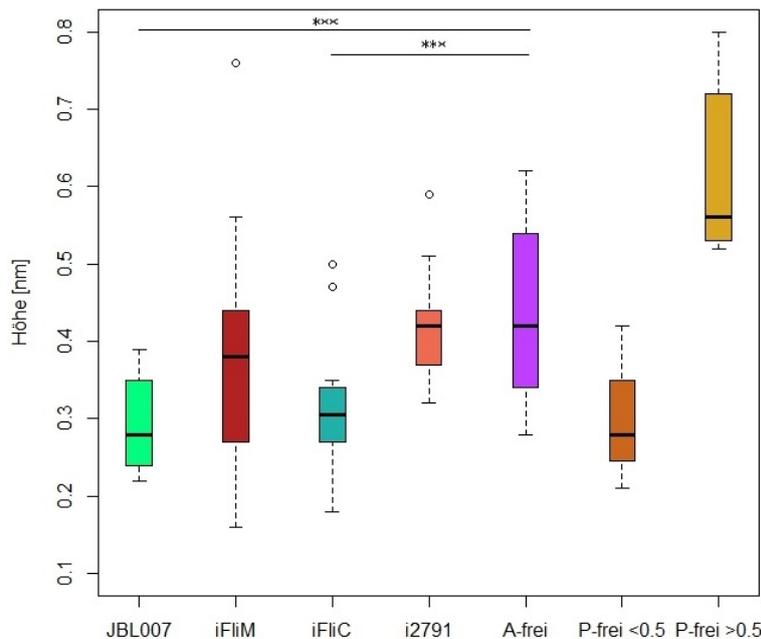


Abbildung 29: Boxplots der gemessenen Höhen (in nm) der Proben. Die Stichprobengrößen betragen für JBL007 n = 16, iFliM n = 21, iFliC n = 16, i2791 n = 15, acetatfreies Xanthan n = 30, pyruvatfreies Xanthan < 0.5 nm n = 3 und für das pyruvatfreie Xanthan > 0.5 nm n = 5. Ein U-Test ergab für JBL007 und das acetatfreie Xanthan, sowie für iFliC und das acetatfreie Xanthan signifikante Ergebnisse (p-Wert < 0.001), was in der Grafik mittels der zwei Signifikanzlinien gezeigt ist. Für das pyruvatfreie Xanthan konnte aufgrund der geringen Stichprobengröße kein U-Test berechnet werden.

Anhand der Rasterkraftmikroskopiebilder und der in Gwyddion gemessenen Höhen ließ sich erkennen, dass die Grenze der Höhe zwischen Einzel- und Doppelsträngen vermutlich bei etwa 0.5 nm lag. Die Polymere, welche höher als 0.5 nm waren, wirkten auf den Mikroskopiebildern deutlich heller. Besonders gut war dies beim pyruvatfreien Xanthan zu erkennen, dessen hohe Stränge (n = 5) einen Mittelwert von 0.63 nm besaßen. Damit ist das pyruvatfreie Xanthan das einzige untersuchte Xanthan, in dem relativ sicher auf doppelsträngige Strukturen geschlossen werden konnte. Bei den anderen untersuchten Xanthanen kamen höhere Bereiche fast ausschließlich innerhalb eines Polymers vor, das ansonsten einzelsträngig war (vgl. z.B. Abbildungen 13 und 24).

In diesen Fällen kam es eventuell zur Zurückfaltung des Polymers aufgrund der recht geringen Persistenzlängen, wodurch höhere Bereiche entstanden. Alle Xanthanarten lagen also vermutlich überwiegend als Einzelstränge vor, nur das pyruvatfreie Xanthan wies klar abgrenzbare doppelsträngige Strukturen auf. Das acetatfreie Xanthan wies dafür gehäuft doppelsträngige Bereiche in den ansonsten einzelsträngigen Polymeren auf.

Aufgrund des in der Einleitung erwähnten Effektes des „probe broadening“ konnte die Breite der Xanthanstränge nicht aus den rasterkraftmikroskopischen Bildern berechnet werden. So ist aus den Daten keine Schlussfolgerung darüber möglich, ob die Xanthanstränge im Fall des pyruvatfreien Xanthans als Doppelhelix vorlagen, oder als zwei einzelne Stränge, welche übereinander lagen und verbunden waren ohne als Helix verwunden zu sein. In Röntgenbeugungsexperimenten wurde aber darauf geschlossen, dass Xanthan sehr wahrscheinlich als rechtsgewundene Helix vorliegt (Moorhouse et al., 1977). Im Gegensatz zum einfachen Doppelstrang-Modell, ist davon auszugehen, dass eine Helixbildung energetisch günstiger ist. Der Durchmesser einer Doppelhelix liegt unter physiologischen Bedingungen normalerweise bei etwa 2 - 2.5 nm (Sato et al., 1984). Es ist zu beachten, dass die in Lösung gebrachten Xanthanstränge für die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen auf Glimmerplättchen aufgebracht und getrocknet wurden. Sie lagen also nicht wie im physiologischen Zustand in Flüssigkeit vor. Dadurch erreichten die Polymere nicht die gleiche Höhe und es entstanden die hier merklichen Abweichungen in den gemessenen Höhen. Desweiteren ist zu beachten, dass während der Messungen am Rasterkraftmikroskop der Cantilever immer mit einer gewissen Kraft auf die Probe drückt. Die Probe wird während der Messung zusammengedrückt, so dass die Höhe von etwa 2 nm einer Doppelhelix bei rasterkraftmikroskopischen Messungen nicht erreicht wird. Da der Cantilever während jeder Messung die Proben in etwa der gleichen Größenordnung staucht, lässt sich dieser Effekt zumeist vernachlässigen, es handelt sich also um einen relativen, systematischen Messfehler. Die Höhen von sowohl Einzel- als auch Doppelsträngen werden aufgrund dieses Messfehlers um die gleiche Größenordnung geringer.

Die Mutationen der *X. campestris* Stämme scheinen sich also nur geringfügig in manchen Fällen auf die Höhe und damit die Anzahl der die Xanthane formenden Stränge auszuwirken. Die größten Auswirkungen auf die Höhe hatten die Mutationen der Stämme die das acetatfreie, als auch das pyruvatfreie Xanthan produzierten. Dies zeigten unter anderem die signifikanten Ergebnisse des U-Tests. Das acetatfreie Xanthan unterschied sich signifikant von dem Xanthan des Ausgangsstammes JBL007 als auch von dem des Stammes iFliC.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße des pyruvatfreien Xanthans lassen sich nur Vermutungen anstellen, dass die hohen Stränge bei der Berechnung eines Signifikanztests sehr wahrscheinlich signifikante Ergebnisse im Vergleich zum Ausgangsstamm ergeben würden.

Die fünf hohen Stränge mit einem Mittelwert von 0.63 nm stehen in deutlichem Unterschied zu den Höhen der anderen Proben, deren Mittelwerte mindestens um 0.2 nm geringer sind. Desweiteren lagen in der Probe des pyruvatfreien Xanthans als einzigstes auch eine höhere Anzahl doppelsträngiger Polymere vor.

5.3 Konturlänge

Die Konturlängen der sechs Proben unterschieden sich recht stark voneinander, was besonders durch die hohe Variabilität innerhalb der einzelnen Proben auffiel. Anhand der Daten war erkennbar, dass die Konturlängen aller Proben stark und über einen großen Bereich schwankten (vgl. Abbildung 30). Die Variabilität war in allen Proben relativ zu ihrem Mittelwert in etwa gleich hoch (vgl. Standardabweichungen der Konturlängen in Tabelle 2), auch wenn die Mittelwerte (bzw. Mediane in Abb. 30) unterschiedliche Werte annahmen. Berechnet man die Standardabweichungen mit ein, so lagen die Proben alle in etwa der gleichen Größenordnung da in jeder Probe Stränge unterschiedlichster Längen vorkamen. Die Standardabweichung war in vielen Fällen annähernd so groß wie der eigentliche Mittelwert der jeweiligen Probe. Die *X. campestris* Stämme synthetisieren die verschiedenen Xanthanarten dementsprechend in unterschiedlicher Länge. Da Xanthan sich als Polymer aus vielen Pentasaccharideinheiten zusammensetzt, kann ein Molekül theoretisch beliebig lang aufgebaut werden. Ein U-Test nach Mann-Whitney ergab für die Xanthane der *X. campestris* Stämme iFliC und iFliM ein signifikantes Ergebnis (p -Wert < 0.05). Erneut konnte für das pyruvatfreie Xanthan wegen der geringen Stichprobengröße kein U-Test berechnet werden.

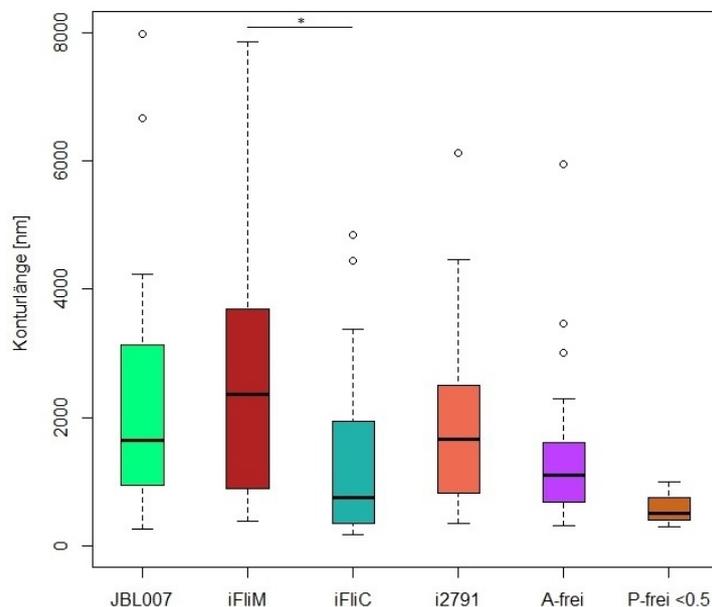


Abbildung 30: Boxplots der gemessenen Konturlängen (in nm) der Proben. Die Stichprobengrößen betragen für JBL007 $n = 16$, iFliM $n = 21$, iFliC $n = 16$, i2791 $n = 14$, acetatfreies Xanthan $n = 30$ und für das pyruvatfreie Xanthan < 0.5 nm $n = 3$. Die Doppelstränge des pyruvatfreien Xanthans konnten nicht in die Grafik aufgenommen werden, da durch die Verzweigung der Stränge keine Berechnung der Konturlänge möglich war. Ein U-Test ergab für iFliM und iFliC ein signifikantes Ergebnis (p -Wert < 0.05), was in der Grafik mittels einer Signifikanzlinie gezeigt ist. Für das pyruvatfreie Xanthan konnte aufgrund der geringen Stichprobengröße kein U-Test berechnet werden.

Die Mutationen der *X. campestris* Stämme wirken sich höchstwahrscheinlich auf die Konturlänge der exkretierten Polymere aus. Der signifikante Unterschied der Konturlänge zwischen dem Xanthan des Stammes iFliC und dem des Stammes iFliM lässt sich eventuell mit der in der Einleitung erläuterten Energiehypothese erklären. Dem *X. campestris* Stamm iFliC fehlt durch die Mutation nur die Flagelle, der Basalapparat ist noch vorhanden. Dem Stamm iFliM fehlt dagegen auch der Basalapparat. Bei iFliC ist der Basalapparat trotz der fehlenden Flagelle noch funktionsfähig. Durch Energieaufwendung kann so Arbeit geleistet werden, aufgrund der fehlenden Flagelle ist das Bakterium nur nicht mehr in der Lage sich eigenständig zu bewegen. Die Energieaufwendung in den Basalapparat fehlt bei dem *X. campestris* Stamm iFliM. Da der Rotor bei iFliC im Leerlauf betrieben wird, wird dort wahrscheinlich weniger Energie investiert als im Fall von iFliM. So kommt es zu einer graduellen Abstufung der Energieaufwendung. JBL007 wendet den standardmäßigen Energiebetrag auf, iFliC hingegen aufgrund des im Leerlauf betriebenen Basalapparats weniger. Bei iFliM wird aufgrund des ganz fehlenden Basalapparats gar keine Energie mehr in die Flagelle aufgewendet. So kann der *X. campestris* Stamm iFliM unter Umständen mehr Energie in die Synthese des Polysaccharids investieren, welche bei iFliC noch in den Basalapparat eingehen würde. Das Ergebnis sind längere Xanthanstränge bei iFliM, was sich in den Daten widerspiegelt.

Im Gegensatz dazu steht, dass das Xanthan des Ausgangsstammes JBL007 mit seiner Konturlänge in etwa in der gleichen Größenordnung lag wie das von iFliM, obwohl *X. campestris* JBL007 seinen Basalapparat noch besitzt. Hier greift die Hypothese des Energieaufwands nicht. Es besteht die Möglichkeit, dass die Synthese des Xanthans in Bezug auf die Konturlänge in allen *X. campestris* Stämmen rein zufällig geschieht. Dafür sprechen die hohen Standardabweichungen, die Werte in der Größenordnung des jeweiligen Mittelwerts annehmen. Eine weitere Möglichkeit den Sachverhalt zu erklären, wäre, dass aufgrund der vor der Auswertung getroffenen Vorauswahl der zu analysierenden Polymere nur die langen Polymere den Auswertungskriterien entsprachen. Um die Stränge im Programm Easyworm auswerten zu können, müssen sie einzeln vorliegen, ohne andere Polymere zu kreuzen. So könnte die mittlere Länge systematisch zu hoch bestimmt worden sein. Wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, trifft die Energiehypothese also nicht auf die Höhe der Xanthanstränge zu, sondern wirkt sich eher auf die Konturlänge der Proben aus.

Die flachen Polymere des pyruvatfreien Xanthans besaßen die geringste Konturlänge aller Proben. Hier ist allerdings zu beachten, dass die Stichprobengröße ($n = 3$) zu gering ist, um wirkliche Aussagen zur Gesamtheit der Stränge des pyruvatfreien Xanthans machen zu können. Die geringe gemessene Konturlänge kam vermutlich dadurch zustande, dass durch die manuelle Vorauswahl der Polymere nur die kurzen Stränge den Kriterien entsprachen. Da ein Großteil der Polymere der Probe gleichzeitig sowohl einzel-, als auch doppelsträngige Bereiche enthielt, war die Wahrscheinlichkeit einzeln liegende Polymere homogener Höhe abzubilden noch geringer. Um die Aussage über die Konturlänge des pyruvatfreien Xanthans bestätigen zu können, sollten weitere Daten aufgenommen werden.

Die Mutationen der *X. campestris* Stämme scheinen sich auf die Konturlänge der verschiedenen Xanthanarten auszuwirken. Die Energiehypothese erklärt den mittels U-Test bestimmten signifikanten Unterschied zwischen den Xanthanen iFliC und iFliM. Durch den fehlenden Basalapparat, ist iFliM in der Lage mehr Energie in die Xanthanproduktion zu investieren, was sich in der Länge der Stränge zeigt. Besonders bei den Strängen des pyruvatfreien Xanthans muss allerdings beachtet werden, dass eine Stichprobengröße von $n = 3$ keine allgemeingültige Aussage über die Probe bietet. Hier ist eine erneute Aufnahme von Daten besonders sinnvoll, um die Längen mit den anderen Proben vergleichen zu können.

5.4 Persistenzlänge

Anhand der Daten (s. Tabelle 2) ist erkennbar, dass sich die Persistenzlängen der Proben unterschieden. Da das Programm Easyworm für die Persistenzlängen nur einen Gesamtmittelwert ausgibt, nicht aber die Werte der einzelnen Stränge einer Probe, konnte für die Persistenzlängen kein U-Test berechnet werden. Wie auch die Konturlänge, schwankte die Persistenzlänge zwischen den Proben deutlich. Der Ausgangsstamm JBL007 lag mit einer mittleren Persistenzlänge von $33 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ im unteren Bereich, war also verhältnismäßig flexibel. Aufgrund des einzelsträngig vorliegenden Xanthans JBL007 verdeutlichte die geringe Persistenzlänge auch die geringe Steifigkeit, welche bei Einzelsträngen zu erwarten war, da diese mehr Bewegungsmöglichkeiten aufweisen als doppelsträngige Polymere.

Das Xanthan des *X. campestris* Stammes iFliC war mit $37 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ nur geringfügig steifer, wohingegen iFliM mit $54 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ Persistenzlänge schon deutlich steifer war. Da in der Probe iFliM auch einige wenige doppelsträngige Bereiche innerhalb der Polymere auftraten (diese fehlten in der Probe iFliC), war die höhere Persistenzlänge von iFliM die logische Konsequenz. Die Persistenzlänge von i2791 lag trotz einiger weniger vorkommender Doppelstränge nur bei $22 \text{ nm} \pm 9 \text{ nm}$ und stellte die geringste Persistenzlänge der sechs Proben dar. Rechnet man die Standardabweichung mit ein, so bewegte man sich schon in der Größenordnung des Xanthans des *X. campestris* Stammes JBL007. Aufgrund des noch relativ geringen Stichprobenumfangs von i2791 ($n = 14$) ist es wie auch bei den Höhenmessungen möglich, dass durch die getroffene Vorauswahl zufällig vermehrt Einzelstränge den Analysekr Kriterien entsprachen und so die Persistenzlänge systematisch zu klein bestimmt wurde. Die Persistenzlängen des pyruvatfreien Xanthans stimmten mit den Vorhersagen überein. Die einzelsträngigen Polymere hatten eine relativ geringe Persistenzlänge ($38 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$), wohingegen die doppelsträngigen Polymere deutlich steifer waren ($81 \text{ nm} \pm 17 \text{ nm}$). Die große Standardabweichung ist hier auf die geringe Stichprobengröße zurückzuführen. Die Polymere, welche sowohl einzel- als auch doppelsträngige Bereiche aufwiesen, passen ebenfalls in das Muster. Die einzelsträngigen Bereiche wirkten gewundener, während die hohen, doppelsträngigen Bereiche keine engen Windungen aufwiesen. Das pyruvatfreie Xanthan wies als einziges der sechs Proben Verzweigungen in den Strangstrukturen auf, diese kamen aber ausschließlich in doppelsträngigen Bereichen vor. Das acetatfreie Xanthan lag mit einer mittleren Persistenzlänge von $47 \text{ nm} \pm 11 \text{ nm}$ in der Mitte der gemessenen Persistenzlängen der sechs Proben. Da in der Probe sowohl Einzel- als auch Doppelstränge vorkamen, nimmt die Persistenzlänge einen mittleren Wert der gemessenen Proben ein.

5.5 Zusammenfassung der Strukturparameter

Die sechs untersuchten Proben wiesen wiederkehrende Muster innerhalb der drei Strukturparameter (Höhe, Konturlänge und Persistenzlänge) auf (vgl. Tabelle 3). In allen Proben waren die Höhe und die Persistenzlänge annähernd in Einklang zu bringen. Höhere, doppelsträngige Polymere wiesen auch eine höhere Persistenzlänge, also eine höhere Steifigkeit auf. Einzelsträngige Polymere hingegen besaßen eine geringere Persistenzlänge. Dies ließ sich schon visuell anhand der Bilder erkennen, da die Einzelstränge in recht kurzen Abständen teils enge Windungen aufwiesen (vgl. z.B. Abbildung 16), wohingegen die Doppelstränge weitere Windungen bildeten (vgl. z.B. Abbildung 28 rechts). Die Mehrheit der Proben lag als Einzelstrang vor, nur das pyruvatfreie Xanthan wies exakt abgrenzbare Doppelstränge auf, wobei anhand der Rasterkraftmikroskopiebilder nicht erklärt werden konnte, ob es sich um eine Helixstruktur oder zwei verbundene Einzelstränge handelte. Die anderen Xanthane besaßen doppelsträngige Anteile fast ausschließlich in Strängen, die ansonsten einzelsträngig waren. Die Mittelwerte der Konturlängen der Proben unterschieden sich, rechnete man allerdings die Standardabweichungen mit ein, dann lagen die Konturlängen in etwa in der gleichen Größenordnung. Die Variabilität der Stranglängen war dementsprechend sehr hoch, in jeder Probe kamen Polymere fast aller Längen (zwischen 500 nm und 8000 nm) vor.

5.6 Auswirkungen auf die Viskosität

Die Viskosität der Proben unterschied sich besonders stark (vgl. Tabelle 2). Während der Ausgangsstamm JBL007 eine Viskosität von 15090 mPas bei einer Scherrate von 0.2 s^{-1} aufwies, wiesen die anderen Stämme fast alle höhere Viskositäten auf. Die Xanthane der *X. campestris* Stämme iFliC und iFliM hatten bei gleicher Scherrate eine etwa doppelt so hohe Viskosität wie JBL007 (26170 mPas und 28760 mPas), das pyruvatfreie Xanthan sogar eine annähernd sechsmal so hohe (97650 mPas). Nur das acetatfreie Xanthan lag mit einer Viskosität von 12300 mPas noch geringfügig unter der von JBL007.

Das pyruvatfreie Xanthan wies also nicht nur in seiner Struktur enorme Unterschiede zu den anderen Proben auf, sondern auch in seiner Viskosität. Neben Doppelsträngen fanden sich im pyruvatfreien Xanthan außerdem die oben erwähnten Verzweigungen der Stränge, welche das Xanthan auffächerten und ihm eine baumartige Struktur verliehen. Ist eine Pyruvatgruppe an eine Mannoseeinheit gebunden, so kommt es zur Abstoßung der Seitenketten des Polymers aufgrund der negativen Ladungen. Das Polymer kann auf diese Weise weniger intramolekulare Bindungen über die Seitenketten eingehen. Fehlt das Pyruvat, so fehlt dem Molekül also eine negative Ladung an der Mannoseseitenkette. Durch die fehlende Ladung könnte die elektrostatische Abstoßung zwischen verschiedenen Polymeren abgeschwächt werden. Auf diese Weise ist es möglich, dass die Seitenketten des Polymers eher Bindungen mit anderen Molekülbereichen eingehen, wodurch es schneller zur Bildung einer effektiven Vernetzung der Polymere kommt. So könnte die hohe Viskosität in Lösung zustande gekommen sein. Dies steht im Gegensatz zu den von Sandford et al. (1977) gefundenen Ergebnissen. Sie fanden heraus, dass Xanthan, welches mehr Pyruvat an den Mannoseseitenketten gebunden hat, viskoser ist. Das von Sandford et al. verwendete Xanthan war nicht von einer Mutante von *X. campestris* exkretiert worden, sondern wurde nachträglich chemisch verändert und so die Pyruvatgruppen abgespalten. Desweiteren wurde die Zunahme der Viskosität bei einer Zunahme der Salzkonzentration der Lösung festgestellt. Wird die Salzkonzentration der Lösung in welche das pyruvatisierte Xanthan gegeben wird erhöht, so sind mehr geladene Ionen vorhanden, welche die negativ geladenen Pyruvatgruppen des Xanthans abschirmen. So können eher Bindungen eingegangen werden. Aus diesem Grund kann die höhere Viskosität des pyruvatisierten Xanthans im Gegensatz zu der hier festgestellten höheren Viskosität nicht-pyruvatisierten Xanthans entstanden sein.

Ein wichtiger Faktor bei der Analyse der Viskosität von Xanthan stellt dementsprechend die Ionenstärke der Lösung dar, durch welche sich große Unterschiede in der resultierenden Viskosität ergeben können.

Da in fast allen Proben überwiegend Einzelstränge vorlagen und nur in der Probe des pyruvatfreien Xanthans klar abgrenzbar sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Polymere vorkamen, bleibt die Frage offen, wie *X. campestris* das Polymer nach der Synthese in das umgebende Medium exkretiert. Es besteht die Möglichkeit, dass das Polymer als Einzelstrang exkretiert wird und sich anschließend aufgrund der fehlenden Pyruvatgruppen zurückfalten kann. Auf diese Weise könnte es zur Bildung doppelsträngiger Strukturen, als auch zur Bildung der für diese Probe charakteristischen Verzweigungen kommen. Die anderen Proben, welche das Pyruvat noch enthielten, hatten wahrscheinlich aufgrund der negativen Ladung nicht die gleichen Möglichkeiten intra- oder intermolekulare Bindungen der Seitenketten einzugehen. So kam es nicht im gleichen Maße zu einer Zurückfaltung des Stranges und zu weniger Vernetzung der Polymere, weshalb die Viskosität der anderen Proben geringer war und diese Proben nur geringe Anteile an doppelsträngigen Polymeren enthielten. Die Verzweigungen des pyruvatfreien Xanthans könnten ebenfalls am Zustandekommen der hohen Viskosität beteiligt sein, da das Molekül auf diese Weise mehr Kontaktbereiche mit anderen Molekülen besitzt und die Interaktionswahrscheinlichkeit erhöht wird.

Die Konturlänge des pyruvatfreien Xanthans schien auf den ersten Blick keinen Einfluss auf dessen hohe Viskosität zu haben, da die Einzelstränge nur eine mittlere Länge von $605 \text{ nm} \pm 366 \text{ nm}$ besaßen. Es ist allerdings zu beachten, dass die Stichprobengröße für die Einzelstränge nur $n = 3$ betrug und somit keine gesicherten Aussagen getroffen werden können. Darüber hinaus konnte für die Doppelstränge aufgrund der Verzweigungen innerhalb des Moleküls die Konturlänge nicht bestimmt werden. Anhand der Mikroskopiebilder war dennoch sichtbar, dass die Doppelstränge durchaus eine größere Konturlänge aufwiesen als die Einzelstränge (vgl. Abbildung 28 rechts). Berechnet man für den erkennbaren Doppelstrang in Abbildung 28 rechts die Konturlänge für die größte Entfernung von einem Ende zum anderen, so erhielt man eine Länge von 1764 nm , was ungefähr der dreifachen Länge der Einzelstränge entspricht. Die Konturlänge scheint so doch einen Einfluss auf die Viskosität der Probe zu haben. Anhand eines höheren Stichprobenumfangs könnte der Einfluss der Konturlänge auf die Viskosität gesichert bestätigt werden.

Das acetatfreie Xanthan wies mit 12300 mPas eine geringfügig kleinere Viskosität auf als der Ausgangsstamm JBL007. Bradshaw et al. (1983) fanden bei Viskositätsmessungen acetatfreien Xanthans keinen Unterschied zur Viskosität von acetyliertem Xanthan. Darüber hinaus fanden sie bei Gelchromatographien der verschiedenen Xanthanarten keine Unterschiede im Molekulargewicht, das acetatfreie Xanthan glich dem vom Wildtyp exkretierten Xanthan. Tako und Nakamura (1984) stellten nach Viscoelastizitäts- und Viskositätsmessungen die Hypothese auf, dass an Xanthan gebundene Acetylgruppen die intramolekularen Wechselwirkungen vergrößern. Fehlen die Acetylgruppen, so werden die Seitenketten des Polymers flexibler. Die Ergebnisse decken sich mit den am Rasterkraftmikroskop erhaltenen Daten. Das acetatfreie Xanthan lag zu einem Großteil als Einzelstrang vor, es kamen nur wenige Doppelstränge vor. Fehlen den Einzelsträngen die Acetylgruppen, so kommt es nach Tako und Nakamura zu weniger intra- und intermolekularen Wechselwirkungen, wodurch auch die Viskosität den geringfügig kleineren Wert annahm als die des Ausgangsstammes JBL007. Hinzu kommt, dass die Stränge des acetatfreien Xanthans im Mittel relativ kurz waren, was die Interaktionsmöglichkeiten im Gegensatz zu den anderen Xanthanen ebenfalls verringerte und somit nicht die oben genannten gelartigen Strukturen ausgebildet werden konnten.

Die Viskositäten der Proben iFliC und iFliM waren etwa doppelt so hoch wie die von JBL007, im Vergleich zum pyruvatfreien Xanthan lag die Viskosität aber noch im unteren Bereich. Im Gegensatz zum acetat- und pyruvatfreien Xanthan ist die genaue chemische Zusammensetzung des Xanthans bei iFliC und iFliM unbekannt, da die Mutationen in erster Linie Auswirkungen auf den Phänotyp von *X. campestris* haben und nicht auf das synthetisierte Xanthan. Der Grund für die höhere Viskosität dieser Proben ist wie auch schon beim acetat- und pyruvatfreien Xanthan eine Mischung aus vielen Faktoren. Die Xanthane der Stämme iFliC und iFliM wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Höhe oder der Konturlänge zum Xanthan des Ausgangsstammes JBL007 auf. Das Xanthan des Stammes iFliC war nur geringfügig höher und steifer als das Xanthan JBL007, außerdem lag die Konturlänge von iFliC deutlich unter der Konturlänge des Ausgangsstammes. Es ist nicht ersichtlich, wieso die Viskosität von iFliC im Gegensatz zu JBL007 einen doppelt so hohen Wert annahm. Bei dem Xanthan des Stammes iFliM hingegen lag die Konturlänge über der von JBL007, außerdem kamen einige wenige doppelsträngige Bereiche vor, welche die mittlere Persistenzlänge erhöhten. Vergleicht man die Strukturparameter von iFliC und iFliM miteinander, so wird deutlich, warum das Xanthan iFliM – wie auch im Vergleich JBL007 – eine geringfügig höhere Viskosität aufwies, als das Xanthan iFliC.

Die mittlere Konturlänge iFliMs war fast doppelt so hoch. Auf diese Weise konnten mehr Bindungen zwischen den Molekülen eingegangen werden, da die längeren Stränge mehr Kontaktstellen mit anderen Molekülen boten. Darüber hinaus hatten die wenigen Doppelstränge im Xanthan iFliM einen in einem geringen Maße viskositätserhöhenden Einfluss. Warum iFliC eine relativ hohe Viskosität aufwies, muss anhand weiterer Daten geklärt werden. Neben den bekannten Faktoren, welche Einfluss auf die Viskosität haben, scheint es weitere Faktoren zu geben, welche die Viskosität des Xanthans verändern können. Dies könnte unter anderem das Molekulargewicht sein, welches schon Gegenstand einiger Untersuchungen war (Bradshaw et al., 1983 und Sho et al., 1986).

Aufgrund der geringen Stichprobengrößen ist die Berechnung von Korrelationen für die einzelnen Strukturparameter in Bezug auf die Viskosität der Xanthanproben statistisch nicht abgesichert. Die im folgenden angegebenen Werte für die nicht-parametrischen Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten r_s sind nur als Tendenz zu werten und müssen mithilfe eines größeren Stichprobenumfangs überprüft werden. Die Berechnung eines nicht-parametrischen Korrelationskoeffizienten war nötig, da nicht alle Proben normalverteilt vorlagen, was sich höchstwahrscheinlich durch den geringen Stichprobenumfang erklären lässt. Im Hinblick auf die Auswertung wurde außerdem eine gewisse Vorauswahl der rasterkraftmikroskopischen Xanthanbilder getroffen um nach Möglichkeit einzeln liegende Stränge auswerten zu können, welche sich nicht überlappen.

Berechnet man den Rangkorrelationskoeffizienten für alle fünf Proben gemeinsam gegen die Viskosität, so ergab sich für die Konturlänge ein Wert von $r_s = -0.1$, für die Persistenzlänge $r_s = 0.5$ und für die Höhe $r_s = 0.1$. Das Xanthan i2791 musste von der Berechnung ausgeschlossen werden, da für diese Probe kein Viskositätswert vorlag. Die erhaltenen Daten widersprachen den oben dargelegten Erklärungen für die Viskositäten, da sie unter anderem für die Konturlänge eine sehr geringe negative Korrelation aufzeigen. Berechnet man die Korrelationen ohne das pyruvatfreie Xanthan mit einzubeziehen, so ergab sich für die Konturlänge ein Wert von $r_s = 0.8$, für die Persistenzlänge $r_s = 0.4$ und für die Höhe $r_s = -0.2$. Das Auslassen des pyruvatfreien Xanthans ist aufgrund der sehr geringen Stichprobengrößen gerechtfertigt. Besonders bei der Konturlänge war – wie oben bereits erwähnt – die Messung für das pyruvatfreie Xanthan unvollständig, da für die doppelsträngigen, verzweigten Stränge keine Konturlänge berechnet werden konnte. Da diese auf den Mikroskopiebildern nichtsdestotrotz länger wirkten als die Einzelstränge des pyruvatfreien Xanthans, fehlte bei der Berechnung der Korrelation aller Proben dieser Teil.

Der Wert $r_s = 0.8$ für die Konturlänge ohne das pyruvatfreie Xanthan gibt so den sichersten Hinweis auf einen hohen Einfluss der Konturlänge auf die Viskosität. Für die anderen Strukturparameter war die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten unter Ausschluss des pyruvatfreien Xanthans aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ebenfalls sinnvoll. Die Persistenzlänge hatte mit $r_s = 0.4$ einen geringeren Einfluss als die Konturlänge, was die Ergebnisse bereits nahegelegt haben. Die geringe negative Korrelation der Höhe mit der Viskosität der Proben ($r_s = -0.2$) kam sehr wahrscheinlich dadurch zustande, dass der Anteil an doppelsträngigen Bereichen in den Strängen des acetatfreien Xanthans die mittlere Höhe der Probe erhöht. Die anderen Proben (JBL007, iFliC und iFliM) lagen annähernd auf einer Geraden. Das acetatfreie Xanthan fällt aufgrund der Kombination einer geringen Viskosität und einer durch doppelsträngige Bereiche größer bestimmten mittleren Höhe als Ausreißer auf. Wie oben erwähnt, kommt es aufgrund der fehlenden Acetylgruppen an den Seitenketten des Moleküls zu weniger Wechselwirkungen mit anderen Molekülen und als Resultat ergibt sich die geringe Viskosität in Verbindung mit dem gemessenen Höhenmittelwert.

Aufgrund der Datenlage muss die oben aufgestellte Hypothese, dass die Konturlänge der Xanthane keine Auswirkungen auf deren Viskosität in Lösung ausübt (H_2), verworfen werden. Bei Vorliegen längerer Stränge entstehen mehr Möglichkeiten zur intermolekularen Wechselwirkungen zwischen einzelnen Strängen, ein langes Polymer kreuzt mit höherer Wahrscheinlichkeit eine höhere Zahl anderer Stränge als ein kurzes Polymer. Durch die vielen Kontaktpunkte kommt es durch die flächendeckendere Vernetzung eher zur Bildung eines gelartigen Mediums zwischen dem Xanthan und dessen Lösungsmittel und damit zu der höheren Viskosität.

Die Hypothese H_3 – Steifere Polymere bilden eine viskosere Lösung als flexiblere Polymere – kann zu diesem Zeitpunkt weder verworfen noch exakt bestätigt werden. Neben der Konturlänge trägt die Persistenzlänge zur Erhöhung der Viskosität der Proben bei, wenn auch in geringerem Maße als die Konturlänge. Dies bestätigten auch die berechneten Korrelationskoeffizienten. Um das Ausmaß der Auswirkungen feststellen zu können ist ebenfalls die Aufnahme neuer Daten und die Überprüfung der Daten (insbesondere ein höherer Stichprobenumfang des pyruvatfreien Xanthans) angemessen.

6. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden mithilfe des Rasterkraftmikroskops Xanthane verschiedener Stämme des Bakteriums *Xanthomonas campestris* untersucht. Die Xanthane wurden mithilfe des WLC-Modells für Polymere ausgewertet und auf ihre Strukturparameter (Höhe, Persistenzlänge und Konturlänge) hin analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass fünf der sechs analysierten Proben überwiegend als Einzelstränge mit geringer Steifigkeit vorlagen; in ihnen kamen nur zu einem geringen Anteil doppelsträngige Bereiche vor. Nur das pyruvatfreie Xanthan wies neben Einzelsträngen auch Doppelstränge und Verzweigungen innerhalb der Stränge auf. Die Polymere wiesen dementsprechend eine höhere Steifigkeit auf. Die Variationsbreite der Konturlänge war in allen Proben sehr hoch, wobei die mittlere Konturlänge sich stark zwischen den Proben unterschied. Die Viskosität zeigte bei dem pyruvatfreien Xanthan den größten Unterschied zum Ausgangsstamm JBL007. Durch die fehlende negativ geladene Pyruvatgruppe kommt es vermehrt zu intramolekularen Wechselwirkungen und zur Klumpung der Polymere, wodurch die sehr hohe Viskosität des pyruvatfreien Xanthans im Gegensatz zu den Viskositäten der anderen Xanthane entstand. Insgesamt lässt sich ein eventueller Zusammenhang der Konturlänge der Stränge mit der Viskosität erkennen. Längere Stränge bilden verzweigtere netzartige Strukturen, durch welche es zu mehr Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Strängen kommt und auf diese Weise die Viskosität der Lösung erhöht wird. Die Persistenzlänge der Stränge trägt ebenfalls, aber in geringerem Ausmaß zur Viskositätssteigerung der Lösung bei. Die Höhe der Xanthanstränge ließ sich in den allermeisten Fällen mit der Persistenzlänge in Einklang bringen. Höhere (doppelsträngige) Xanthanstränge weisen eine höhere Persistenzlänge, also eine höhere Steifigkeit auf. Die Höhe trägt also in ähnlichem Ausmaß wie die Persistenzlänge zur Erhöhung der Viskosität des gelösten Xanthans bei.

Erneute Messungen könnten Aufschluss geben über den genauen Einfluss der Strukturparameter auf die Viskosität der einzelnen Xanthanarten. Für zukünftige Untersuchungen und um sicherzustellen, dass die gemessenen Daten die Gesamtheit jeder einzelnen Probe korrekt wiedergeben, sollten unter anderem mehr Daten erhoben werden. So lassen sich die erhaltenen Werte überprüfen und weitere Gründe für die verschiedenen Viskositäten der unterschiedlichen Proben finden. Auch die Bindungskräfte der einzelnen Atome im Xanthanmolekül könnten zu seiner Gestaltgebung und seinen Viskositätseigenschaften beitragen. Mithilfe von kraftspektroskopischen Messungen ließen sich so weitere Einblicke in den Aufbau des Polymers gewinnen.

Außerdem können weitere Parameter, wie z.B. das Molekulargewicht des Xanthans oder der pH-Wert der Lösung in die Untersuchung einbezogen werden um deren Einfluss auf die Viskosität und die Struktur der unterschiedlichen Xanthane zu testen.

7. Literatur

- Abels, J.A. et al., 2005, *Single-Molecule Measurements of the Persistence Length of Double-Stranded RNA*, Vol. 88, **pp. 2737-2744**, Biophysical Journal
- Arendt, O., Kulicke, W.-M., 1998, *Determination of the viscoelastic properties of a homologous series of the fermentation polymer xanthan gum*, Vol. 259, **pp. 61-67**, Die Angewandte Makromolekulare Chemie
- Bradshaw, I.J. et al., 1983, *Modified Xanthan - Its preparation and Viscosity*, Vol. 3, **pp. 23-38**, Carbohydrate Polymers
- Bustamante, C. et al., 2003, *Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics*, Vol. 421, **pp. 423-427**, Nature
- Callet, F. et al., 1987, *Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution*, Vol. 9, **pp. 291-293**, International Journal of Biological Macromolecules
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2009, *Biologie*, 8. aktualisierte Auflage, **pp. 749/750**, München, Pearson Deutschland GmbH
- Cotterill, R., Übersetzung: Dr. Bärbel Häcker, 2008, *Biophysik*, **pp. 33-36**, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fixman, M., Kovac, J., 1973, *Polymer conformational statistics. III. Modified Gaussian models of stiff chains*, Vol. 58, Nr. 4, **pp. 1564-1568**, The Journal of Chemical Physics
- Gottschalk, G., 2015, *Welt der Bakterien, Archaeen und Viren*, 1. Auflage, **pp. 285-287**, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Harder, A., 2009, *Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- Hublik, G., 2012, *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Vol. 10, **pp. 221-229**, Amsterdam, Elsevier B.V.
- Kratochvíl, P., Suter U.W., 1989, *Definitions of terms relating to individual macromolecules, Their assemblies, and dilute polymer solutions*, Vol. 61, No. 2, **pp. 211-241**, Pure & Applied Chemistry

- Lamour, G. et al., 2014, *Easyworm: an open-source software tool to determine the mechanical properties of worm-like chains*, Source Code for Biology and Medicine
- Legleiter, J., 2009, *The effect of drive frequency and set point amplitude on tapping forces in atomic force microscopy: simulation and experiment*, Vol. 20, **pp. 10**, Nanotechnology
- Lipson, S.G., Lipson, H.S., Tannhauser, D.S., Übersetzung: Holger Becker, 1997, *Optik*, **pp. 212-215**, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag
- Mäntele, W., 2012, *Biophysik*, **pp. 259-262**, Stuttgart, Eugen Ulmer KG
- Marko, J.F., Siggia, E.D., 1995, *Stretching DNA*, Vol. 28, **pp. 8759-8770**, Macromolecules
- Meyer, E., 1992, *Atomic Force Microscopy*, Vol. 41, **pp. 3-49**, Progress in Surface Science
- Moorhouse, R. et al., 1977, Vol. 45, **pp. 90-102**, A.C.S. Symposium Series
- Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P., 1999, *Atomic Force Microscopy for Biologists*, **pp. 5-7, 32-34, 44-49, 61**, London, Imperial College Press
- Ogden, R.W. et al., 2006, *On worm-like chain models within the three-dimensional continuum mechanics framework*, Vol. 462, No. 2067, **pp. 749-768**, Proceedings of the Royal Society A
- Rademacher, C., 2007, *Temperaturstabilisierte Rasterkraftmikroskopie an lebenden eukaryotischen Zellen*, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld
- Rubinstein, M., Colby, R.H., 2003, *Polymer Physics*, **pp. 50-57**, New York, Oxford University Press
- Sandford, P.A. et al., 1977, *Variation in Xanthomonas campestris NRRL B-1459: Characterization of Xanthan Products of Differing Pyruvic Acid content*, No. 45, **pp. 192-210**, A.C.S. Symposium Series
- Sarid, D., Elings, V., 1991, *Review of Scanning Force Microscopy*, Vol. 9, No. 2, **pp. 431-437**, Journal of Vacuum Science & Technology
- Sato, T. et al., 1984, *Double-Stranded Helix of Xanthan in Dilute Solution: Further Evidence*, Vol. 16, No. 5, **pp. 423-429**, Polymer Journal
- Shatwell, K.P. et al., 1990, *Influence of acetyl and pyruvate substituents on the solution properties of xanthan polysaccharide*, Vol. 12, **pp. 71-78**, International Journal of Biological Macromolecules

- Sho, T. et al., 1986, *Viscosity Behaviour and Persistence Length of Sodium Xanthan in Aqueous Sodium Chloride*, Vol. 25, **pp. 307-313**, Biophysical Chemistry
- Smith, I.H. et al., 1981, *Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution*, Vol. 3, **pp. 129-134**, International Journal of Biological Macromolecules
- Steffens, T., 2015, *Optimization of the metabolic flux towards xanthan biosynthesis in Xanthomonas campestris pv. campestris*, Vortrag, unpubliziert, Universität Bielefeld
- Tako, M., Nakamura, S., 1984, *Rheological properties of Deacetylated Xanthan in Aqueous Media*, Vol. 48, **pp. 2987-2993**, Agricultural and Biological Chemistry
- Vorhölter, F.J. et al., 2007, *The genome of Xanthomonas campestris pv. campestris B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis*, Vol. 134, **pp. 33-45**, Journal of Biotechnology
- Van der Maarel, J.R.C., 2008, *Introduction to Biopolymer Physics*, **pp. 10**, Singapur, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Waigh, T.A., 2007, *Applied Biophysics - A Molecular Approach for Physical scientists*, **pp. 171/172**, Chichester (UK), John Wiley & Sons Ltd.
- Weitze, M.D., 2003, *Das Rasterkraftmikroskop*, **pp. 6, 21-23**, München, GNT-Verlag

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für die Möglichkeit bedanken, meine Bachelorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben.

Herrn Prof. Dr. Karsten Niehaus danke ich für die Erstellung des Erstgutachtens, die Bereitstellung der Xanthan-Proben und die Hilfe bei allen relevanten Fragen zu meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Volker Walhorn bedanke ich mich für die Einführung in das AFM und die konstruktiven Diskussionen zu den verschiedensten Problemen, die während der Durchführung und Auswertung der Messungen aufgetreten sind. Außerdem möchte ich ihm für die Erstellung des Zweitgutachtens und das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Bei Herrn Tim Steffens bedanke ich mich für die Bereitstellung der Xanthan-Proben und die Hilfe bei allen biotechnologisch relevanten Fragen.

Bei meinen Bürokollegen Jonathan Schröder und Armin Grundmann möchte ich mich für die Hilfestellung bei sämtlichen computerrelevanten Problemen bedanken.

Bei Luisa Beckmann und Sebastian Johannes Knust bedanke ich mich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Personen der AG Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften für die schöne und spannende gemeinsame Zeit bedanken.